



Sanna Aho, Paula Haipus & Iiris Väre

SYLJEN ALFA-AMYLAASIENTSYYMIN MITTAUS PITKÄAIKAISSTRESSIN DIAGNOSOINNISSA

SYLJEN ALFA-AMYLAASIENTSYYMIN MITTAUS PITKÄAIKAISSTRESSIN DIAGNOSOINNISSA

Sanna Aho
Paula Haipus
Iiris Väre
Opinnäytetyö
Kevät 2012
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Sanna Aho, Paula Haipus, Iris Väre

Opinnäytetyön nimi: Syljen alfa-amylaasientsyymin mittausta pitkäaikaistressin diagnosoinnissa

Työn ohjaajat: Paula Reponen ja Annikki Savolainen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2012

Sivumäärä: 52 + 16 liitesivua

Alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus syljessä on tutkimusaiheeltaan ajankohtainen; tutkimuksissa on huomattu, että se on yhteydessä autonomiseen hermostoon ja stressiin, joka on hyvin yleinen ilmiö nyky-yhteiskunnassa. Pitkäaikaistressin diagnosoinnissa käytettäviä menetelmiä on todettu olevan syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuusmittauksen lisäksi muitakin; poikkeavilla seerumin ja syljen kortisolipitoisuudella sekä sykevälivaihtelulla on havaittu olevan yhteys stressiin. Tutkimuksemme toimeksiantaja oli BioOption Oy.

Tavoitteenamme oli selvittää, voiko syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuusmittausta käyttää kertamittauksena pitkäaikaistressin arvioinnissa, sekä arvioida muiden potentiaalisten diagnostimenetelmien yhteyttä pitkäaikaistressiin.

Tutkimusaineistona käytimme haastattelulomakkeista, veri- ja sylkinäytteistä sekä sykevälivaihtelusta saatua tietoa. Haastattelulomakkeisiin tutkimushenkilöt arvioivat oman stressitilansa. Verinäytteistä analysoitiin seerumin kortisolipitoisuus, sylkinäytteistä analysoitiin sekä kortisolipitoisuus että alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus. Arvioimme tutkimushenkilöiden stressitilaa haastattelulomakkeista saatujen tietojen avulla ja vertasimme saamiamme tutkimustuloksia koehenkilöiden kokemaan stressitilaan.

Tutkimustulostemme mukaan syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuusmittausta ei voida käyttää kertamittauksena pitkäaikaistressin arvioinnissa. Muiden käyttämiemme mittausten sekä pitkäaikaistressin yhteyksien löytäminen oli myös haastavaa.

Tutkimusjoukkomme pienestä koosta johtuen emme saaneet kerättyä riittävän laajaa aineistoa. Emme siis voineet tehdä tutkimustuloksistamme varmoja johtopäätöksiä. Tulevissa tutkimuksissa syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuutta tulisi mitata tätä pidemmällä aikavälillä, jotta saataisiin kattavampaa tietoa stressin ja alfa-amylaasin välisestä yhteydestä.

Asiasanat: Stressi, sylki, alfa-amylaasi, kortisoli, sykevälivaihtelu

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Sanna Aho, Paula Haipus, Iiris Väre

Title of thesis: Use of Salivary Alpha-amylase Enzyme in Diagnosing Long-term Stress

Supervisors: Paula Reponen and Annikki Savolainen

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2012

Number of pages: 52 pages + 16 pages of appendices

Activity of salivary alpha-amylase enzyme is a current and interesting topic in research. Stress is a very common phenomenon in today's society, and researchers have discovered connection between the autonomic nervous system, stress and salivary alpha-amylase. Besides salivary alpha-amylase enzyme activity measurement, researchers have developed other methods to diagnose long term stress; deviant cortisol values in serum and saliva and low heart rate variability have been discovered to have a connection with stress. This study was assigned by BioOption Oy.

The main goal of this study was to resolve if measurement of salivary alpha-amylase enzyme activity can be used as a single method of analysis in diagnosing long-term stress. Besides salivary alpha-amylase, we also examined other potential methods in diagnosing long-term stress.

This study used quantitative methods for data collection. We used interview forms, serum and saliva samples and measurement of heart rate variability to collect data. On interview forms, subjects evaluated their level of stress. Cortisol levels were analyzed from serum and saliva samples, activity of alpha-amylase enzyme was measured from saliva samples. These results were compared with the stress levels of our subjects, which were calculated from the interview forms. Results were demonstrated with charts and diagrams.

Findings revealed that most likely salivary alpha-amylase enzyme activity measurement cannot be used as a single method of analysis in diagnosing long-term stress. It was also difficult to find connections between long-term stress and other methods used in this study.

In future studies, salivary alpha-amylase enzyme activity should be measured over a longer period of time to gain comprehensive information about salivary alpha-amylase's connection with long-term stress.

Keywords: Stress, saliva, alpha-amylase, cortisol, heart rate variability

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	6
2 STRESSI JA ELIMISTÖN STRESSITASON MITTAAMINEN.....	8
2.1 Stressi.....	8
2.1.1 Stressin vaikutukset	10
2.1.2 Stressikäsitteen historia.....	11
2.2 Syljen alfa-amylaasi.....	12
2.3 Kortisoli	16
2.4 Sykevälivaihtelu	18
3 NÄYTTEENOTON VAKIOINTI.....	20
3.1 Sylkinäytteenotto	20
3.2 Verinäytteenotto	21
4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT	23
5 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN	24
5.1 Tutkimusjoukko.....	24
5.2 Näytteenoton ja sykevälivaihtelumittauksen toteuttaminen	24
5.3 Näytteiden analysointi	27
5.4 Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi.....	28
6 TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY	29
6.1 Tutkimushenkilöiden kokeman stressitilan yhteys tutkimustuloksiin.....	29
6.2 Syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuusmittaus pitkäaikaistressin diagnosoinnissa.....	41
7 POHDINTA	45
LÄHTEET	48
LIITTEET	53

1 JOHDANTO

Kvantitatiivisen tutkimuksemme tarkoituksena oli selvittää syljen alfa-amylaasientsyymin merkitystä pitkäaikaissstressitilassa. Tutkimuksessa arvioimme, onko syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden määrittäminen varteenotettava menetelmä pitkäaikaissstressin mittaamisessa. Tutkimusmateriaalina käytimme haastattelulomakkeita, veri- ja sylkinäytteitä sekä sykevälivaihtelua. Verinäytteistä määritimme seerumin kortisolipitoisuuden ja sylkinäytteistä kortisolipitoisuuden sekä alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden. Arvioimme tutkimushenkilöiden stressitilaa heidän täyttämien haastattelulomakkeiden avulla ja vertasimme saamiamme tutkimustuloksia koehenkilöiden kokemaan stressitilaan.

Aiheeseen opinnäytetyöhön saimme syksyllä 2010 koulumme ideapankista. Tutkimustamme rahoittaa BioOption Oy. Alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus syljessä on ajankohtainen tutkimusaihe, koska tutkimuksissa on huomattu, että se on yhteydessä stressiin. Stressi on hyvin yleinen ilmiö nyky-yhteiskunnassa, ja siitä puhutaan paljon. Jokainen ihminen kokee stressiä jossakin vaiheessa elämää. Kehitteillä on muun muassa vieritestejä, joilla voidaan mitata syljessä alfa-amylaasientsyymin pitoisuutta, joka kertoisi elimistön stressitilasta. Vieritestit olisivat hyödyllisiä muun muassa työterveyshuolloissa, koska niillä saataisiin mitatuksi nopeasti mahdollinen stressi. Näin välttyttäisiin monilta laboratoriokokeilta, sillä hyvin usein stressaantuneet hakeutuvat lääkärin hoitoon jonkin muun vaivan takia, vaikka oireiden alkuperä saattaa ollakin pelkästään stressistä johtuvaa. Sylkivierite testi on myös potilaalle huomattavasti miellyttävämpi vaihtoehto, sillä sylkinäytteenotto on nopeampi ja kivuttomampi kuin esimerkiksi suoniverinäytteenottoon.

Henkilökohtaisena tavoitteenamme oli oppia yhteistoiminnallisuutta sekä kehittää ammattitaitoa niin asiakaspalvelussa kuin aineiston analysoinnissakin. Tavoitteenamme oli myös tuottaa tietoa ja tuloksia tuleviin tutkimuksiin, jotka liittyvät syljen alfa-amylaasin ja stressin väliseen yhteyteen.

Opinnäytetyötämme ohjasivat lehtori Paula Reponen, sairaalakemisti Simo Rasi koululamme toimivasta Pharmatest Oy:stä sekä osastonjohtaja Annikki Savolainen, englannin kielen lehtori Marketta Rusanen ja äidinkielen lehtori Marja Kuure. Opinnäytetyöprosessin apuna olivat myös vertaisarvioijat sekä opiskelijaryhmät bio8sn ja bio9sa. Tutkimuksesamme tulosten arvioinnissa apuna toimi myös työterveyspsykologi. Hankimme tutkimusluvut Oulun seudun ammattikorkeakoulun Sosiaali- ja terveysalan yksiköltä, sekä tutkimustamme rahoittavalta BioOption Oy:ltä.

2 STRESSI JA ELIMISTÖN STRESSITASON MITTAAMINEN

Stressi on nykypäivänä hyvin yleinen ja tiedostettu ilmiö väestössä. Se mielletään yleensä huonoksi, elämää haittaavaksi tekijäksi. Kaikki stressi ei kuitenkaan ole haitallista, sillä stressillä on hyvä vaikutus useassa tilanteessa. Keskeisintä stressin haitallisuuden kannalta on se, onko stressi tilapäistä vai jatkuvaa, sekä se, kuinka yksilö reagoi stressiin. (Duodecim 2009, hakupäivä 12.10.2011; Aldridge 2001, 93.)

2.1 Stressi

Stressi ei ole sairaus, vaan elämään kuuluva normaali ilmiö, jota aiheuttavat hyvin monenlaiset asiat. Elimistön kiihtymistilan katsotaan olevan stressiä. Kiihtymistila alkaa psyykkisenä ja johtaa fyysiseen elimistön kiihtymistilaan. Näitä kiihtymistiloja aiheuttavat muun muassa sekä kielteiset että myönteiset elämänmuutokset, kuten avioero, läheisen kuolema tai esimerkiksi rakastuminen ja lapsen saaminen. (Lönnqvist 2009, hakupäivä 12.10.2011.) Se, miten elimistö reagoi erilaisiin elämänmuutoksiin, riippuu hyvin paljon yksilön vastustus- ja sietokyvystä, näkökulmista ja asenteista. (Mattila 2010, hakupäivä 14.1.2010)

Elämänmuutoksista selviäminen siis riippuu henkilön kyvyistä sopeutua muutokseen. Jokainen reagoi stressiin omalla tavallaan. Toiselle hyvin pieni vastoinkäyminen saattaa tuntua toisesta erittäin suurelta. Esimerkiksi useiden minuuttien odottelu puhelinjonossa saattaa nostattaa verenpainetta, tai odottelua saattaa pitää rentouttavana taukona. Tärkeää on se, kuinka ihmiset kohtaavat stressiä aiheuttavat asiat. (Aldridge 2001, 92, 100)

Stressiä ei kuitenkaan pidä aina ajatella pahana, ulkoapäin tulevana haittana, joka saa ihmisen voimaan pahoin. Pääpiirteissään ihmisen reaktiot stressitekijöihin syntyvät aivojen ohjaamasta hormonien ja välittäjäaineiden vuorovaikutuksesta, jonka päätarkoitus on lisätä voimavaroja havaitusta uhasta selviytymiseen. Elimistö valmistautuu pakoon tai taisteluun, mikä tarkoittaa uhan välttämistä tai kohtaamista. Tällöin elimistö kohdis-

taa energiansa lihaksiin paon tai taistelemisen avuksi. Sydämen lyönnit tihenevät, hengitys kiihtyy ja verenpaine nousee. Normaali verenkierto muuttuu, sillä ruuansulatusjärjestelmistä, munuaisista ja iholta ohjataan verta lihaksille. (Aldridge 2001, 94–95.) Lyhytkestoinen stressi luo paineita, mikä taas auttaa suoriutumaan kohdatusta haasteesta paremmin. Pieni stressi saa ihmisen yrittämään parhaansa, jolloin se voi olla myös positiivinen voimavara. (Mattila 2010, hakupäivä 14.1.2010; Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri 2006, hakupäivä 17.10.2011.)

Stressin kolme tyyppiä ovat eustressi, neustressi ja distressi. Eustressi on positiivista stressiä, joka koetaan innostavana ja motivoivana. Ihminen ei koe sitä uhkaavaksi tai pahaksi. Rakastuminen tai jonkin harrastuksen tuoma jännitys ovat hyviä esimerkkejä tällaisesta stressistä. Neustressi ei aiheuta erityisen hyvää eikä erityisen pahaa mielialaa. Se on eräänlaista välimaastoa, jollaista aiheuttaa esimerkiksi toisella puolella maapalloa sattunut suuronnettomuus. Tapahtuma on meille kaukana asuville ikävä, mutta se ei merkitse meille sellaista uhkaa, joka aiheuttaisi varsinaisesti stressiä. Distressi sen sijaan on pahaa stressiä, mutta sekin voidaan jakaa kahteen erilaiseen tyyppiin. Akuutti muoto on tavallisesti voimakasta, mutta häviää ja lievittyy melko nopeasti. Kroonisessa distressissä vaikuttava stressitekijä ei ole samalla tavalla ärhäkäs kuin akuutissa tyyppissä. Krooninen distressi saattaa kestää muutamista päivistä jopa vuosiin. Distressiä pidetään haitallisena ja vaarallisena terveydelle, koska paha stressi saa elimistön pysyvään virhetilaan, mikä voi aiheuttaa monenlaisia terveyshaittoja. (Vartiovaara 2008, 16–17.)

Elimistön ihannekohta stressihormonien tuotannon kannalta on siinä, missä eustressi muuttuu distressiksi. Tämä voidaan havaita eläinkokeillakin. Tässä tilanteessa stressihormonit ovat optimaalisella tasolla ja fyysinen suorituskyky on huipussaan. Stressin muuttuessa distressiksi optimaalinen tilanne on ohitse, jolloin stressi aiheuttaa ihmiselle terveyshaittoja. (Vartiovaara 2008, 17–18.)

2.1.1 Stressin vaikutukset

Stressireaktio käynnistyy aivojen kuorikerroksesta, josta lähetetään varoitusmerkki aivojen hypothalamus-osaan, mikä saa kehon valmiustilaan. Hypotalamus puolestaan vie viestiä eteenpäin keskushermoston sympaattisia osia pitkin lisämunuaisiin, mikä saa aikaan sen, että lisämunuaisten ydinosa vapauttaa adrenaliinia ja noradrenaliinia ja lisämunuaisten kuoriosaa alkaa tuottaa kortisolia. Kortisolin tuotanto tapahtuu hitaammin kuin adrenaliinin ja noradrenaliinin. (Vartiovaara 2008, 29; Aldridge 2000, 97.) Tämän monimutkaisen reaktion tapahtumiseen menee aikaa vain sekunnin murto-osa, jolloin nämä niin sanotut stressihormonit vapautuvat ja leviävät verenkierron kuljettamana kaikkialle elimistöön (Vartiovaara 2008, 29–30).

Autonominen hermosto koostuu kahdesta vastakkaisesta järjestelmästä, sympaattisesta ja parasympaattisesta hermostosta. Ihmisen stressaantuessa sympaattinen hermosto aktivoituu, kun taas parasympaattisella hermostolla on päinvastainen vaikutus elimistössä. Sympaattinen hermosto saa elimet reagoimaan stressiin sekunneissa. Noradrenaliini on sympaattisten hermopäätteiden tärkein välittäjäaine, joka vaikuttaa muun muassa masennukseen. Se saa myös verisuonet supistumaan, jolloin verenpaine kohoaa. Se yleensä myös terästä elimistön vastaanottamaan ongelmatilanteen. (Aldridge 2000, 96.)

Lisääntyneiden välittäjäaineiden erityksen huomaa sydämen sykkeen kiihtymisestä, syljen erityksen vähenemisestä ja kämmenten hikoilemisesta. (Kerttula 1999, hakupäivä 14.1.2011.) Stressitilanteen ollessa ohi parasympaattinen hermosto aktivoituu ja palauttaa kehon toiminnan normaaliksi. (Ruttle 2008, hakupäivä 14.1.2011.)

Stressiä voi kuvailla myös liian suurista paineista aiheutuvaksi ylihälytystilaksi. Jos stressi jatkuu pitkään, alkaa elimistö erittää liikaa stressihormoneja, mikä voi johtaa elimellisiin ja psyykkisiin oireisiin. (Vartiovaara 2008, 30.) Tavallisimpia stressiin liittyviä psyykkisiä oireita ovat muun muassa jännittyneisyyden, levottomuuden ja ahdistuneisuuden tunteet sekä unen häiriöt. Tavallisia ovat myös päänsärky, huimaus, sydämentykytykset, pahoinvointi, ylävatsavaivat, ripuli, tihtynyt virtsaamisen tarve, hikoilu, ihon punoitus sekä monien somaattisten perussairauksien vaikeutuminen. (Lönnqvist 2009, hakupäivä 4.1.2012)

Nykypäivänä työuupumus on hyvin yleistä. Työuupumus on työssä ilmenevä kroonisen stressin ja depressiivisyyden yhdistelmä, joka väsyttää työntekijän kokonaisvaltaisesti, ja hänen asenteensa työtä kohtaan muuttuvat kyynisiksi ja ammatillinen itsetunto heikenee. (Lönnqvist 2009, hakupäivä 4.1.2012)

2.1.2 Stressikäsitteen historia

1300-luvulla stressillä tarkoitettiin ahdinkoa, koettelemusta, vaikeuksia ja vastoin käymisiä. 1600-luvulla se merkitsi kärsimystä, puutetta, deprivaatiota eli psyykkistä niukkuutta, koettelemusta ja haitallisuutta. 1800-luvun lopulla stressille muodostui eräänlainen vertauskuvallinen merkitys. Se tarkoitti sellaista psykologista tilaa, joka pystyy aikaansaamaan sekä fyysisiä että mentaalisia ongelmia. Myöhemmin aikoina stressi on tarkoittanut monenlaisia asioita, kuten paineita, hyökkäystä, rajoittavaa tilannetta sekä sitä, miten elimistö reagoi näihin asioihin. Tieteellisten tutkimusten jatkuessa huomattiin, ettei kaikki stressinä pidetty olekaan haitallista. (Vartiovaara 2008, 15.)

Käsitteen *stressi* toi maailmaan tutkija ja tiedemies Hans Selye. Selye alkoi jo lääketiedettä opiskellessaan 1920-luvulla ihmetellä, että yllättävän usein erilaisista sairauksista kärsivillä potilailla oli hyvin samanlaisia oireita. He olivat vain yleisesti sairaita, mikä oli siihen aikaan uusi ajattelutapa lääketieteessä, sillä tuohon aikaan keskityttiin yksittäisten oireiden ja sairauksien löytämiseen ja kuhunkin vaivaan kehitettiin omia lääkkeitä ja hoitoja. (Rantanen 2007, hakupäivä 20.11.2011.)

Hans Selye oli ensimmäinen, joka todisti, että stressistä saattaa seurata ruumiillisia haittoja. Kokeissaan hän testasi munasarjauutteen vaikutusta rottiin, jonka seurauksena hän sattumalta havaitsi, että rotissa tapahtuvat fysiologiset muutokset johtuivat stressistä, eikä munasarjauutteesta. Kokeessaan hän piikitti rimpuileviin ja hätääntyneisiin rottiin munasarjauutetta, sekä osaan rotista pelkkää suolaliuosta. Kuitenkin kaikille rotille tuli muun muassa paiseita ja suurentuneita lisämunuaisia. Jos ruumiilliset muutokset olisivat johtuneet munasarjauutteesta, olisi muutoksia tullut vain rottiin, joihin hän sitä piikitti. Rotat reagoivat kömpelöön käsittelyyn stressaantumalla, jolloin jatkuva elimistön kortisolin tuotanto aiheutti ruumiilliset muutokset. (Aldridge 2001, 99.) Hän tutki myös

monen muun aineen, kuten formaliiniin ja epäpuhtauksia sisältävän veden, vaikutusta koe-eläimiin. Joskus hän myös altisti koe-eläimet fyysisille haittatekijöille, kuten röntgensäteilylle, palohaavoille, kylmyydelle ja fyysisille ruhjeille. Koe-eläimet reagoivat aina samalla tavalla ja samoin spesifisin oirein, olipa haitallinen asia mikä tahansa. (Vartiovaara 2008, 22.) Kokeiden seurauksena hän havaitsi, että koe-eläinten lisämunuaiset laajenivat ja kiihdyttivät toimintaansa kun taas imurauhaset sekä kateenkorva ja rintaontelossa sijaitseva rauhanen kutistuivat. Lisäksi mahalaukkuun ja suolistoon kehittyi haavoja. (Rantanen 2007, hakupäivä 4.1.2012.)

Vaikka Selye olikin merkittävä stressin tutkija, hän ei osannut ottaa huomioon ihmisten yksilöllisiä psyykkisiä ominaispiirteitä ja kykyä selviytyä stressistä. Uusissa tutkimuksissa painotetaan henkilökohtaisten tekijöiden ja ominaisuuksien suurta merkitystä stressin aikana. Nykyisin esimerkiksi tiedetään, että vain alle 20 % ihmisistä kykenee toimimaan tehokkaasti kriisitilanteessa. (Vartiovaara 2008, 31.)

2.2 Syljen alfa-amylaasi

Syljen alfa-amylaasientsyymi, toiselta nimeltään ptyaliini, erittyy sylkirauhasista. Sen tehtävänä on aloittaa tärkkelysmolekyylien pilkkominen glukoosiksi suussa. (Holum 1997, 641.) Syöessä tärkkelyspitoista ruokaa, kuten perunaa tai leipää, syljen amylaasin toiminnan vuoksi ruoka muuttuu pureskeltaessa hieman makean makuiseksi tärkkelyksen pilkkoutuessa sokereiksi. (Hiltunen, Holmberg, Kaikkonen, Lindblom-Yläne & Niensted 2003, 529–530.)

Syljen alfa-amylaasi pilkkoo liukenemattoman tärkkelyksen 1,4-glukoosiketjuja, muuttaen tärkkelystä liukenevaan muotoon, polysakkarideiksi, oligosakkarideiksi ja glukoosimolekyyleiksi. Syljen amylaasilla ei ole kauan aikaa toimia suussa. Kuitenkin sen toiminta on nopeaa ja sulatus jatkuu ruokamassan sisässä mahalaukkuun asti. Amylaasi inaktivoituu ruokamassan päätyessä mahalaukkuun, sillä mahahappojen aiheuttama happamuus (pH 3,3) estää amylaasin toiminnan. (Amend, Arnold & Mundy 1993, 798–799.)

Alfa-amylaasientsyymi on yksi syljen tärkeimmistä proteiinikomponenteista. Hiilihydraattien pilkkomisen ohella se osallistuu mm. bakteerien kasvun ehkäisyyn. Syljen alfa-amylaasia tuotetaan eksokriinisten sylkirauhasten hyvin erilaistuneissa epiteelisoluissa, jolloin alfa-amylaasi erittyy suoraan sylkeen eikä kierrä hormonien tapaan ihmisen verenkierrossa. Syljen alfa-amylaasista noin 80 % tuotetaan parotisrauhasessa, joka on yksi kolmesta suuresta sylkirauhasesta. Parotisrauhanen tuottaa noin 20–50 % syljestä sen mukaan, stimuloidaanko syljen tuotantoa vai ei. Syljen alfa-amylaasi koostuu kahdesta isoentsyymistä, joista toinen on glykosyloitunut ja toinen ei sisällä hiilihydraatteja. Glykosyloituneen muodon molekyylipaino on noin 57 000 Da ja non-glykosyloituneen muodon noin 54 000 Da. Kaikesta sylkirauhasissa tuotetusta proteiinista alfa-amylaasin osuus on noin 40–50 %. Eläimillä ja ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa on tultu johtopäätöksiin, joiden mukaan autonominen hermosto ohjaa voimakkaasti syljen alfa-amylaasientsyymien sekä syljen tuotantoa. Kaikki tekijät, jotka vaikuttavat syljen tuotantoon, voivat vaikuttaa myös syljen alfa-amylaasin tuotantoon. (Nater & Rohleder 2009a; Nater & Rohleder 2009b.)

Yleisesti on tultu siihen tulokseen, että sympaattisen hermoston stimulaatio johtaa syljessä alfa-amylaasin korkeisiin proteiinikonsentraatioihin, kun taas parasympaattisen hermoston stimulaatio johtaa suureen syljen määrään. Eläimillä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu sekä sympaattisen että parasympaattisen hermoston aktivaation johtavan kohonneisiin syljen alfa-amylaasiarvoihin. (Berger, Ehlert, Gaab, Jud, Kirschbaum, Nater & Rohleder 2005.)

Tutkimusten mukaan syljen alfa-amylaasia pidetään lupaavana biomerkkiaineena sympaattisen hermoston aktiivisuudelle, joka aiheuttaa kehossa tapahtuvat stressistä johtuvat muutokset. Vaikuttaa siltä, että syljen alfa-amylaasi reagoi sekä psyykkisten että fyysisten stressitekijöiden aiheuttamaan sympaattisen hermoston aktivaatioon. Tutkijoiden mielestä vaikuttaa todennäköiseltä, että syljen alfa-amylaasi voi toimia merkkiaineena autonomisen hermoston toiminnalle. (Nater & Rohleder 2009b.)

Syljen alfa-amylaasin erityksellä on oma vuorokausirytmensä. On todettu, että alfa-amylaasitaso on matalimmillaan heti herätessä ja kohoaa pitkin päivää. Unenlaadun ei ole havaittu vaikuttavan aamulliseen amylaasin määrään. Tutkimuksissa suositellaan ot-

tamaan näytteitä useita kertoja tiettyihin kellonaikoihin päivän aikana, jotta syljen alfa-amylaasi pitoisuudesta saadaan kattava käsitys. Sukupuolella tai iällä ei ole havaittu olevan vaikutusta syljen alfa-amylaasin määrään lukuun ottamatta vastasyntyneitä, joiden alfa-amylaasi arvot ovat liian pieniä mitattavaksi. (Nater & Rohleder 2009b.)

Tupakoinnilla, alkoholilla, joillakin lääkkeillä, kofeiinilla, ruoalla ja kovalla fyysisellä harjoittelulla on havaittu olevan vaikutusta syljen alfa-amylaasin määrään. Tästä syystä tutkijat ovat antaneet näytteenottoon liittyen ohjeita, joiden mukaan yllämainittuja asioita tulisi välttää tiettyjä aikoja ennen näytteenottoa tai ainakin kontrolloida niiden määrää. Kofeiinia ja ruokailua tulee välttää tunti ennen näytteenottoa, ja rankkaa liikuntaa ei tule harrastaa tutkimukseen osallistuttaessa. Normaali fyysinen aktiivisuus on sallittua. Tupakointi, alkoholin- sekä tiettyjen lääkkeiden käyttö tulee olla tutkijoiden tiedossa tutkimusta tehdessä. (Nater & Rohleder 2009b.)

Eri tutkimusryhmät ovat tulleet samantapaisiin tuloksiin ja ovat yhtä mieltä siitä, että syljen alfa-amylaasi toimii psyykkisen stressin merkkiaineena. Berger työtovereineen (2005) tutki 24 tervettä aikuista laboratorio-oloissa altistaen heidät stressitestille (TSST). He havaitsivat merkittävän eron stressaantuneen tilan ja lepotilan syljen alfa-amylaasitasossa. Alfa-amylaasi entsyymiin aktiivisuus kohosi stressaavan tilanteen aikana ja sen jälkeen huomattavasti verrattuna stressitestiä edeltävään tilaan ja palautui lähtötasolle seuraavan tunnin aikana. Tutkijat osoittivat, että syljen alfa-amylaasi kohoaa nopeasti akuutin lyhytaikaisen psykososiaalisen stressin vaikutuksesta. Tutkijat tekivät tästä johtopäätöksen, jonka mukaan syljen alfa-amylaasia voidaan pitää hyödyllisenä parametrina stressitutkimuksissa.

Ehlert tutkimusryhmineen (2006) tuli samantapaisiin tuloksiin tutkimuksessaan, jossa tutkimusjoukkona käytettiin 30 tervettä nuorta miestä. Myös he huomasivat selvän muutoksen syljen alfa-amylaasiarvoissa verrattaessa akuuttia stressitilaa sekä lepovaihetta. Amylaasiarvo kohosi merkittävästi psykososiaalisen stressin aikana. Myös he päätyivät tulokseen, jonka mukaan syljen alfa-amylaasia voi pitää luotettavana stressin merkkiaineena. He kuitenkin ottivat huomioon sen, että syljen alfa-amylaasin aktiivisuutta nostavia mekanismeja ei tunneta vielä tarpeeksi. (Ehlert, Florin, Koller, La Marca, Langhans, Moses & Nater 2006.)

Allwood kollegoineen (2011) on tutkinut syljen alfa-amylaasin aktiivisuutta lapsissa. Tutkimusjoukkona oli 56 tervettä lasta ja nuorta, iältään 7–16-vuotiaita. Lapset altistettiin erilaisille stressaaville tilanteille ja heiltä kerättiin sylkinäytteet ennen tilannetta, tilanteen aikana ja tilanteen jälkeen. Syljen alfa-amylaasin huomattiin kohoavan samaan tapaan kuin aikuisilla eli heti altistuttaessa akuutille stressitekijälle. He tulivat myös tulokseen, jossa syljen alfa-amylaasi reagoi laboratorioympäristössä aiheutettuun stressiin nopeammin kuin syljen kortisoli, ja palautui lähtötasolle myös kortisolia nopeammin. (Allwood, Granger, Handwerger, Kivlighan & Stroud 2011.)

Samassa tutkimuksessa havaittiin, että matalan lähtötason syljen alfa-amylaasi on yhteydessä suurempaan sydämen sykkeen reaktiivisuuteen, eli matala lähtötason alfa-amylaasi voi ennakoida voimakkaampaa kardiovaskulaarista reaktiota stressiin. Nämä löydökset tukevat oletusta, jonka mukaan syljen alfa-amylaasi toimisi sympaattisen hermoston aktiivisuuden merkkiaineena. (Allwood ym. 2011.)

Syljen alfa-amylaasin mittaamiseksi on myös kehitelty vieritestilaitteita. Muun muassa Elashoff työtovereineen (2011) on testannut fotometriseen mittaukseen perustuvaa biosensorimenetelmää, jolla voidaan mitata syljen alfa-amylaasia ilman suurta laboratoriota ja laitteistoa. Vieritestillä saatuja tuloksia verrattiin Olympus AU400 analysaattorilla saatuihin tuloksiin, ja ne vastasivat toisiaan erinomaisesti. Tutkimusryhmä tuli johtopäätökseen, jonka mukaan vieritesti soveltuu hyvin syljen alfa-amylaasitason mittaamiseen, sillä se osoittautui tarkaksi ja luotettavaksi. (Elashoff, Robles, Shetty, Yamaguchi & Zigler 2011.)

Kaikki tutkijat eivät kuitenkaan ole olleet yksimielisiä syljen alfa-amylaasin toimivuudesta sympaattisen hermoston toiminnan merkkiaineena. Bosch ym. (2011) tuovat raportissaan esiin poikkeavan mielipiteensä, jonka mukaan tänä päivänä syljen alfa-amylaasin aktiivisuudesta ei ole vielä niin runsaasti tietoa tai tulkintataitoa, että sitä voitaisiin pitää luotettavana merkkiaineena. He kiinnittävät huomiota mm. siihen, että harvalla syljen alfa-amylaasin aktiivisuuden tutkijoista on riittävästi tietoa tai koulutusta suun biologiasta. Tutkijat kritisoivat myös mm. tutkimuksissa käytettyjä sylkinäytteiden

keräämismenetelmiä sekä niistä kertomisen puutteellisuutta. (Bosch, Geus, Proctor & Veerman 2011.)

2.3 Kortisoli

Kortisoli on tärkein glukokortikoidi. Glukokortikoidit ovat hormoneja, jotka osallistuvat hiilihydraattien aineenvaihdunnan säätelyyn. HPA-akseli eli hypotalamus–aivolisäke–munuaiskuori-akseli ja lisämunuaisen kuorikerros alkavat erittää steroidihormoneja, joista tärkein on kortisoli. HPA-akseli toimii siten, että hypotalamus erittää CRF-hormonia, eli kortikotropiinia vapauttavaa tekijää, joka antaa aivolisäkkeelle käskyn tuottaa ACTH-hormonia, eli kortikotropiinia. ACTH puolestaan stimuloi lisämunuaiskuoren tuottamaan kortisolia. Korkea kortisolitaso aiheuttaa myös osteoporoosia sekä kasvuhormonien- ja sukupuolihormonien erityshäiriöitä. (Ljung & Friberg 2004, hakupäivä 12.1.2011; Salimetrics 2009–2011.)

Kortisoli säätelee itse tuotantoaan negatiivisen palautteen kautta, eli se palaa verenkierron kautta takaisin hypotalamukseen ja rajoittaa CRF:n ja ACTH:n eritystä ja laskee omaa tasoaan. Tuotantoa säädellään uni–valve-rytmin mukaisesti niin, että aamulla kortisolitaso on korkeimmillaan ja iltaa kohden taso laskee. Krooninen stressi ja traumaattiset tapahtumat johtavat veren epänormaaliin kortisolitasoon, jonka aiheuttaa HPA-järjestelmän epänormaali säätely. Kun kortisolia vapautuu verenkiertoon, sillä on vaikutuksia elimistön aineenvaihduntaan, solujen kasvuun, verenkiertoon, immuunijärjestelmään ja myös mielialojen vaihteluun. (Sane 2000, 261–262, 270, 304.)

Pitkään jatkuva stressi aiheuttaa muutoksia aivokemiassa ja heikentää erityisesti HPA-akselin tasapainoa. Kortisolireseptoreiden määrä vähenee aivoissa sijaitsevassa hippokampusessa jatkuvan stressin seurauksena, jolloin herkkyys reagoida kortisolin määrään heikkenee. Jos hippokampuksen herkkyys pienenee, HPA-akseli keikahtaa vähitellen pois tasapainostaan, koska hippokampus on HPA-akselin tärkein palautteen antaja. Kortisoli siis kiinnittyy kortisolireseptoreihin, ja mitä enemmän reseptoreita on, sitä tehokkaammin ne reagoivat kortisoliin ja viestivät hypotalamukselle käskyn lopettaa kortisolin erityksen. (Aldridge 2001, 104, 106.)

Kortisoli on vuorovaikutuksessa solujen kanssa silloin, kun se on sitoutuneena johonkin reseptoriin. Näitä reseptoreja ovat glukokortikoidireseptorit (GR) ja mineralokortikoidireseptorit (MR). Glukokortikoidireseptoreja löytyy lähes jokaisesta elimistön kudoksesta. Mineralokortikoidireseptoreja on muun muassa aivoissa hippokampuksen alueella. Nämä steroidireseptori-kompleksit pystyvät säätelemään aloittamalla tai lopettamalla joidenkin spesifisten geenien transkription. Ne siis pystyvät säätelemään proteiinien synteesiä, mikä aiheuttaa fysiologisia muutoksia elimistössä. (Sane 2000, 260–261.)

Mineralokortikoidireseptorit vetävät kortisolia puoleensa kymmenen kertaa suuremmalla vetovoimalla kuin glukokortikoidireseptorit. Tämän johdosta MR sitoo suurimman osan aivoissa olevasta kortisolista silloin, kun stressin taso on matala tasoittaen HPA-akselin toimintaa sekä hillitsemällä stressivasteen alkamista. Kun kortisolin tuotanto lisääntyy, alkaa myös GR sitoa kortisolia. Sen vetovoima kasvaa ja se alkaa toimia vähentämällä HPA-akselin aktiivisuutta ja lopulta lopettaen stressivasteen. Se, mitä solussa tapahtuu, riippuu siitä, kuinka paljon reseptorit ovat sitoneet kortisolia. Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että on olemassa GR geenin eri variaatiota, jotka voivat vaikuttaa solun glukokortikoidiherkkyyteen. Tästä syystä ihmiset reagoivat stressiin eri tavalla. (Salimetrics 2009–2011, hakupäivä 14.1.2011.)

Seerumin kortisolierityksessä on selvä vuorokausirytm: tasot ovat suurimmillaan varhain aamulla ja pienimmillään myöhään illalla. Kortisolin erityis lisääntyy hyvin herkästi erilaisten stressistimulusten vaikutuksesta. Suurin osa kortisolista on sitoutunut seerumissa kantajaproteiiniin ja pieni osa on vapaina, biologisesti aktiivina hormoneina. Kortisolimääritystä käytetään yleensä lisämunuaistautien diagnostiikassa ja hoidon seurannassa. Lievästi kohonneita kortisoliarvoja tavataan esimerkiksi myös lihavuudessa, anoreksiassa, ruumiillisessa ja henkisessä rasituksessa sekä depressiossa. Estrogeenit, raskaus ja ehkäisytabletit lisäävät kantajaproteiinin määrää ja siten kortisolipitoisuutta. Matalia arvoja tavataan lisämunuaiskuoren- ja aivolisäkkeen vajaatoiminnassa. Jos potilaalla on hydrokortisonilääkitys, seeruminäyte on otettava aamulla ennen seuraavaa lääkeannosta. (Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri 2010, hakupäivä 14.1.2011.)

Syljen kortisoli kuvaa seerumin vapaata, biologisesti aktiivista kortisolifraktiota. Syljen kortisolierityksessä on myös vuorokaudenajan vaihtelua. Syljen kortisolipitoisuus on

korkeimmillaan aamulla ja matalimmillaan keskiyöllä. Iltayöllä kerätty syljen kortisoli on sensitiivinen Cushingin oireyhtymän (hyperkortisolismin) seulontatutkimus. (Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri 2011, hakupäivä 5.4.2011.) Dahlgren työtovereineen on havainnut tutkimuksessaan, että uupumus ja stressaavat tilanteet vaikuttavat merkittävästi aamuiseen syljen kortisolin eritykseen. Tutkimus osoittaa, että matalat kortisoliarvot aamulla ovat yhteydessä aamu-unisuuteen, edeltävän päivän uupumiseen ja huonoksi arvioituun terveyden tilaan. Korkeat ilta-arvot liittyvät stressioireisiin sekä huonoksi arvioituun terveyden tilaan. (Dahlgren, Kecklund, Theorell & Åkerstedt 2009.)

2.4 Sykevälivaihtelu

Sykevälivaihtelulla tarkoitetaan sydämen sähköisten toimintojen rekisteröinnissä, elektrokardiografiassa, havaittavaa R-R intervallien välistä vaihtelua. Sykevälivaihtelun on havaittu kuvaavan luotettavasti fysiologisia tekijöitä, jotka vaikuttavat sydämen normaaliin rytmiin. Tutkijoiden mukaan se on hyvä työkalu tutkittaessa autonomiseen hermostoon kuuluvien sympaattisen ja parasympaattisen hermoston vuorovaikutusta. Sykevälivaihteluanalyysistä on myös tullut tärkeä kardiologinen menetelmä, koska mittaukset ovat non-invasiivisia sekä helppoja toteuttaa ja toistaa. Pientä sykevälivaihtelua pidetään epäsuotuisana ennustemerkinä useille sydän- ja verisuonitauksille, ja sen on havaittu olevan pienempi muun muassa korkeaa verenpainetta sairastavilla. (Stauss 2003; Acharya, Joseph, Kannathal, Lim & Suri 2006.)

Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että sydämen sykevälivaihtelu pienenee ihmisen ollessa fyysisesti rasitettu työssään. Tutkimusryhmä tutki fyysisesti raskasta työtä tekeviä ranskalaisia roskakuskeja neljä viikon ajan, joista kolme viikkoa oli raskasta työtä ja yksi viikko lepoa. Tutkimuksessa havaittiin sykevälivaihtelun merkittävä pienentyminen peräkkäisten raskaiden työviikkojen aikana, sekä selvä palautuminen eli sykevälivaihtelun kasvaminen lepo viikon aikana. Tutkijat havaitsivat myös sykevälivaihtelun muutoksen olevan paljon suurempi rasituksen ja levon aikana kuin sydämen leposykkeen muutos. (Antoniadis, Barthélémy, Bourin, Duverney, Garet, Gaspoz, Lacour, Pichot & Roche 2002.)

Sykevälivaihtelu heijastaa autonomisen hermoston verenkiertoa säätelevän hermostonosan tilaa. Vireystilan noustessa henkisen tai fyysisen kuormituksen vuoksi sykevälivaihtelu pienenee. Elimistön rentoutuessa ja esimerkiksi hyvän yön aikana sykevälivaihtelu kasvaa selvästi. Sykevälivaihtelua analysoitaessa pitää muistaa, että normaaliin työpäivän aikana vireystila on suurimman osan ajasta koholla. Samoin harrastus tai tehokas liikunta pitävät vireystilaa koholla ja sykevälivaihtelu on pientä. Tällainen stressi on kuitenkin positiivista, sillä elimistön toiminta tehostuu ja suorituskyky paranee. Sen sijaan esimerkiksi nukkuessa havaittu jatkuva pieni sykevälivaihtelu voi viitata ylikuormitukseen ja kuluttavaan stressiin. (Lindholm 2007, hakupäivä 6.4.2011.)

Sykevälivaihtelumittaus on monipuolinen menetelmä. Sykevälivaihtelun avulla voidaan mitata stressiä ja palautumista, työn kuormitusta, energiankulutusta ja liikunnan vaikuttavuutta. Analyysillä voidaan arvioida myös elämäntapoihin liittyviä riskejä muun muassa diabeteksen kehittymiselle. Elimistön kuormittuminen heijastuu sydämen toimintaan ja edelleen sykevälivaihteluun. (Firstbeat 2010, hakupäivä 1.3.2011.)

Päiväohjelmaa ja sykettä vertaamalla voidaan nähdä, milloin stressaantuminen on ollut huipussaan ja milloin palautuminen on alkanut. Jos henkilö on hyvin stressaantunut, stressitaso ei laske nukkuessakaan, jolloin palautumista ei tapahdu. (Venejärvi 2009, hakupäivä 14.1.2011.)

Shanghaissa tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin muutoksia pitkäaikaisissa sykevälivaihtelutarjoissa eritasoisen ajasta aiheutuvan paineen alla. Tutkimusryhmä käytti tutkimusjoukkonaan kaikin puolin terveitä yliopisto-opiskelijoita, jotka laitettiin tekemään tietokonetöitä eripituisten aikojen rajoissa. Mitä lyhyempi aika tehtävää varten oli varattu, sitä suurempi psyykinen kuormitus tehtävästä aiheutui. Tutkimuksen mukaan tarkasteltaessa sykevälivaihtelua pidemmällä välillä voidaan huomata, että sykevälivaihtelu pienenee nopeutta vaativassa tietokonetyössä psyykkisen paineen alla ja kasvaa paineen helpottuessa edes vähäksi aikaa. (He, Jiang, Qiu, Tong & Zhu 2009.)

3 NÄYTTEENOTON VAKIOINTI

Näytteenotto tulee olla suositusten mukaista, jolla varmistetaan näytteen edustavuus ja luotettavat laboratoriotutkimustulokset. Vakioitu näytteenotto edellyttää, että tutkimustuloksia voidaan verrata viitearvoihin tai potilaan aikaisempiin tuloksiin. Luotettavat tutkimustulokset ovat tärkeä osa potilasturvallisuutta, sillä niiden perusteella tehdään päätöksiä potilaan terveydentilan arvioinnissa. Preanalyttiset tekijät takaavat näytteiden laadun, tutkimustulosten luotettavuuden sekä potilasturvallisuuden. (Mäkitalo & Vainio 2008.)

Preanalytiikkaan kuuluvat laboratorion huolehtimat tai ohjeistamat toiminnot, kuten potilaan valmistelu, näytteenotto, näytteiden kuljetus, käsittely ja säilytys. Myös potilas-kohtaiset kliiniset tekijät ovat tärkeä osa näytteenottoon valmistautumisessa. Potilaan esivalmisteluilla vähennetään tulokseen vaikuttavia mahdollisia häiriötekijöitä. (Joutsio-Korhonen 2010, 206.)

Laboratorion määrittämään tutkimustulokseen vaikuttavat ennen näytteenottoa useat biologiset tekijät, jotka voidaan jakaa geneettisiin ja fysiologisiin tekijöihin. Fysiologisia tekijöitä ovat mm. ruumiinasento näytteenottohetkellä, ruokavalio, paasto, fyysinen rasitus, nautitut aineet (tupakka, kahvi, alkoholi, lääkkeet), ikä, psyykinen stressi ja naisilla kuukautiskierto tai menopaussi. Lisäksi tulokseen voivat vaikuttaa vuorokaudenaika ja jopa vuodenaika. (Kouri, Malminiemi & Pohjanvaara 2003.)

3.1 Sylkinäytteenotto

Sylkinäytteenotossa on paljon preanalyttisiä tekijöitä, jotka tulee huomioida näytteen kontaminaation estämiseksi. Kontaminaatio voi haitata analysointia, ja näin ollen tutkimustulokset eivät ole luotettavia. Preanalyttiset tekijät ovat suurimmaksi osaksi tutkimushenkilöstä riippuvia. Tutkimukseen osallistuvan henkilön on vältettävä fyysistä rasitusta kolme tuntia ja ruokailua tunti ennen sylkinäytteen keräystä. Kortisolilääkkeet vaikuttavat syljen kortisolin pitoisuuteen. Verinen sylki on hyödytön näyte, joten tutki-

mushenkilön ei tule pestä hampaita juuri ennen näytteenottoa mahdollisen verenvuodon välttämiseksi. Suu huuhdellaan puhtaalla vedellä mahdollisista ruuantähteistä ennen keräyksen aloitusta. (Salimetrics, Saliva Collection and Handling Advice 2009, 3–4; Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri 2011, hakupäivä 7.9.2011)

Näyte otetaan Salivette-syljenkeräysputkeen, jonka sisällä on polyesterivanutukko. Vanutukko ei saa joutua käsien kosketukseen, vaan tukko kaadetaan keräysputkesta suuhun. Tukkoa pidetään suussa 1–2 minuutin ajan tai niin, että tukko on vettynyt eikä ime enää sylkeä. Märkä tukko laitetaan takaisin putkeen, jossa on siivilä, jonka avulla sylkinäyte sentrifugoidaan tukosta putken pohjalle. Putkeen merkitään tutkimushenkilön nimi tai tutkimuskoodi sekä keräysaika. Sylkinäyte säilyy vuorokauden huoneenlämmössä, 3–5 päivää jääkaapissa ja pakastettuna pitemmän aikaa. (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri 2011, hakupäivä 7.9.2011.)

Salivette-näytteenottotekniikka on ollut käytössä useimmissa tutkimuksissa, joissa on määritetty syljen kortisolipitoisuutta. Siksi se on usein käytössä myös alfa-amylaasi tutkimuksissa. Syljen keräysmenetelmiä on monia, joissa näyte joudutaan ottamaan asiantuntijan läsnä ollessa. Siksi Salivette-keräysputki on helppo, käytännöllinen ja paras vaihtoehto, jos tutkimushenkilö joutuu ottamaan sylkinäytteet esimerkiksi omalla ajallaan. (Nater & Rohleder 2009a.)

3.2 Verinäytteenotto

Vakioidun suoniverinäytteenoton tärkeänä perustana on asianmukainen potilasohjaus. Hoitajan tulee kertoa miksi tutkimukset tehdään, mitä tutkimuksia tehdään, ja miten tulee valmistautua näytteiden ottoon, jotta tulokset olisivat luotettavia. Perustelu tutkimuksen tarkoituksesta ja tarpeellisuudesta, poistavat potilaalta turhia pelkoja ja motivoivat häntä noudattamaan ohjeita. Laadukkaan lopputuloksen kannalta on tärkeää, että näytteenottaja tiedostaa näytteenottotoiminnan virhelähteet ja osaa arvioida preanalyytisten tekijöiden merkityksen. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2008, 9; Mäkitalo & Vainio 2008, 20–23.)

Seerumista mitattavan kortisolin (S-Korsol) verinäytteenottoa varten ei tarvitse paastota. Yleisiä verinäytteenoton esivalmisteluohjeita tulee kuitenkin noudattaa, kuten rankan fyysisen rasituksen välttäminen ja aloillaan istuminen 15 minuutin ajan, jotta verenkierto tasaantuu. Kortisolilääkkeet vaikuttavat seerumin kortisolin pitoisuuteen. (Yhtyneet Medix laboratoriot 2011, hakupäivä 6.4.2011)

Laskimoverinäytteenotossa tarvittavia välineitä ovat mm. näyteneulat, neulanpidike (holkki), näyteputket, puristusside (staasi), ihonpuhdistuslaput, puhdistusaine, ihoteippi ja käytettyjen neulojen säilytysastia. Näytteenotossa on huomioitava käytettävän neulan koko. Kokoa valittaessa huomioidaan potilaan suonien paksuus ja sijainti sekä käytettävä näytteenottotekniikka (vakuumi-, avo- tai siipineula). Verinäytettä otettaessa staasin käyttö laskimon esille saamisessa tulee rajoittaa. Liian pitkään (yli 1 min) ollut ja liian kireä puristus voivat aiheuttaa näytteen hemolyysoitumista, eli punasolut hajoavat ja hemoglobiini värjää plasman punaiseksi. Hemolyysoitunut näyte vaikuttaa useiden eri tutkimusten tuloksiin, se nostaa esimerkiksi hemoglobiinipitoisuutta. (Tuokko ym. 2008, 39, 41–42; Garza & Becan-McBride 2005, 194–195)

Useimmiten näytteen analysointi vaatii erilaisia toimenpiteitä, jotta näyte on analyysin edellyttämässä muodossa. Seeruminäyte (S-) otetaan putkeen, joka ei sisällä antikoagulanttia ja sen annetaan hyytyä ennen sentrifugointia. Hyytyminen tapahtuu huoneenlämmössä yleensä 30–60 minuutin kuluttua näytteenotosta. Näytteen hyydyttyä seerumiputki sentrifugoidaan, jotta solut laskeutuvat putken pohjalle ja seerumi nousee pintaan. Näin on helppo erotella seerumi eri putkeen analysoitavaksi. (Tuokko ym. 2008, 9–10; Garza & Becan-McBride 2005, 194–195.) Erottelun jälkeen seerumi säilyy vuorokauden huoneenlämmössä, kolme vuorokautta jääkaapissa ja pakastettuna säilyvyys on pidempiaikainen. (Pohjois-pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2011, hakupäivä 7.9.2011.)

4 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tutkimustehtävien päämääränä on selventää tutkittavan asian tarkoitusta. Tutkimustehtävät ovat kysymyksiä, joihin tutkimuksen avulla etsitään vastausta. (Soininen 1995, 64.)

Tutkimustehtävät ovat:

1. Kuinka hyvin sykevälivaihtelumittausten, seerumin kortisolin, syljen kortisolin ja syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden tulokset vastaavat koehenkilön kokemaa stressitilaa?
2. Kuinka hyvin syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden mittaus toimii yksittäisenä, kerran tehtävänä tutkimuksena pitkäaikaistressin diagnosoinnissa?

Tavoitteenamme on selvittää, onko alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus syljessä spesifinen merkkiaine pitkäaikaistressissä. Käytämme tutkimuksessa myös muita fysiologisia mittauksia, joilla on jo ennestään mitattu stressiä onnistuneesti: veren ja syljen kortisolipitoisuus sekä sykevälivaihtelumittaus. Tutkimusryhmämme koostuu henkilöistä, jotka kokevat itsensä stressaantuneiksi. Tutkimusryhmä jaettiin kahtia haastattelulomakkeista saatujen tietojen perusteella stressaantuneiden ja ei-stressaantuneiden ryhmiin. Selvitämme myös, vastaavatko edellä mainittujen tutkimusten tulokset koehenkilön kokemaan stressiin.

5 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

5.1 Tutkimusjoukko

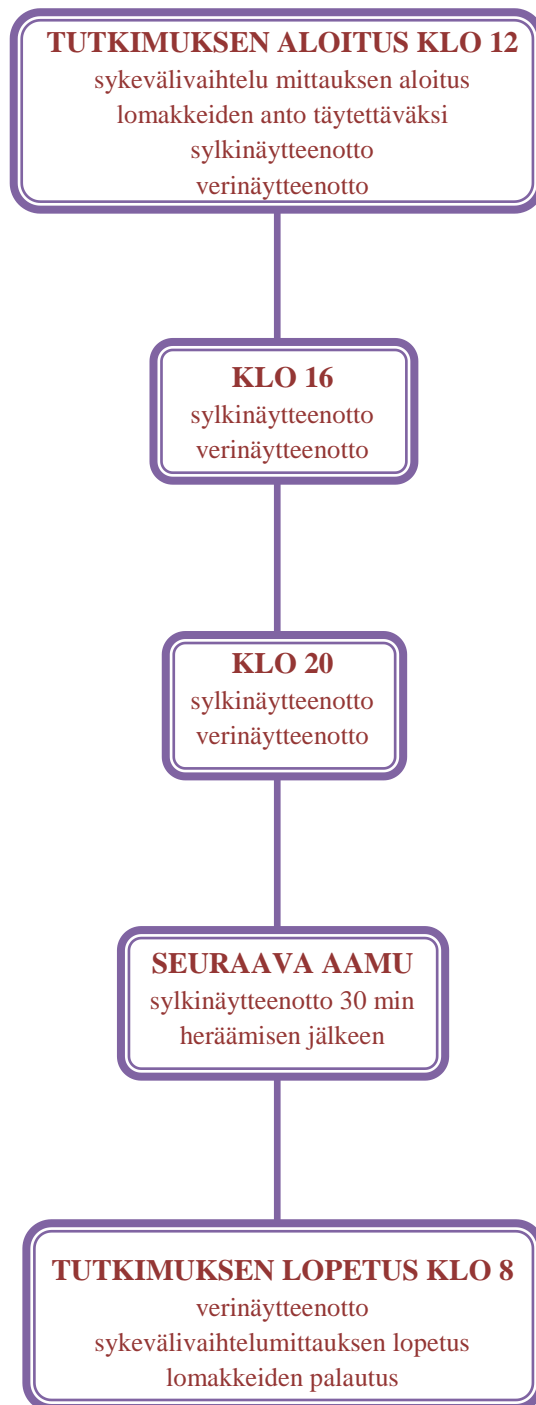
Tutkimusjoukkomme koostuu kymmenestä henkilöstä. Lähetimme kutsukirjeen (liite 1) sähköpostilla kaikille koulumme oppilaille ja henkilökunnalle, jossa kerroimme tarvitsevamme tutkimusryhmään vapaaehtoisia tutkimushenkilöitä, jotka kokevat itsensä pitkäaikaisstressaantuneiksi.

Painotimme kirjeessä, että tutkimushenkilöiltä vaaditaan intensiivistä osallistumista 20 tunnin ajan. Vapaaehtoisia pyydettiin ilmoittautumaan sähköpostitse tai puhelimitse. Tutkittavat henkilöt valittiin ilmoittautumisjärjestyksessä, ja he saivat sähköpostitse ajat näytteenottoon ja valmistautumisohjeet tutkimukseen (liite 3).

5.2 Näytteenoton ja sykevälivaihtelumittauksen toteuttaminen

Tutkimusaineistonaamme olivat sylki- ja verinäytteiden sekä sykevälivaihtelumittauksen tulokset. Lisäksi käytimme aineistonaamme tekemäämme haastattelulomaketta (liite 2) sekä tutkimusta avustavan psykologin omaa lomaketta. Mittauspäiväkirjan (liite 4) avulla voidaan analysoida sykevälivaihtelukäyriä, kuten esimerkiksi uni–valve-rytmiä. Koehenkilö kirjaa mittauspäiväkirjaan kaikki päivän merkittävät tapahtumat.

Sylki- sekä verinäytteenotto tapahtuivat neljänä eri kellonaikana. Näytteenotto on havainnoituna kuviossa 1. Näytteenottoajat olivat kello 12, 16, 20 ja 8. Tutkimus aloitettiin sykevälivaihtelu mittauksen käynnistyksellä kello 12 ja sen jälkeen otettiin veri- ja sylkinäytteet. Kello 12, 16 ja 20 otettavat näytteet otimme koulun näytteenottotiloissa. Seuraavana aamuna tutkimushenkilö otti sylkinäytteen kotonaan puoli tuntia heräämisestään, ennen aamiaista ja hampaiden pesua. Kello 8 tapahtui viimeinen verinäytteenotto koulullamme, jonka jälkeen sykevälivaihtelumittaus lopetettiin ja täytetyt lomakkeet palautettiin. Veri- ja sylkinäytteenotossa otettiin huomioon useat preanalyytiset tekijät, jotka mainitaan viitekehyksessä.



*KUVIO 1: Näytteenottoaika-
taulu*

Tutkimushenkilöille toimitettiin valmistautumisohjeet (liite 3) ennen saapumista tutkimukseen. Tutkimus alkoi kello 12, ja henkilön saavuttua koulumme palvelulaboratorioon, jossa tutkimusaineisto kerättiin, varmistimme heidän noudattaneen ohjeita ennen tutkimuksen aloitusta. Ohjeissa korostetaan ottamaan huomioon sylkinäytteenottoon liittyvät ohjeet, joissa kerrotaan kuinka kauan esimerkiksi syömisestä ja juomisesta tulee olla kulunut. Ohjeessa kehoitetaan myös istumaan 15 minuutiksi ennen verinäytteenottoa verenkierron tasoittumiseksi. Kävimme myös läpi kaikki näytteenottoaikataulut, jolloin sylki- ja verinäytteet otetaan koulullamme ja kehoitimme heitä tulemaan ajoissa paikalle.

Jokaista tutkimushenkilöä pyydettiin allekirjoittamaan suostumuslomake, jotta he tietävät, mihin tarkoitukseen heidän tietojaan ja näytteitään käytetään. Henkilöille annettiin täytettäväksi kaksi haastattelulomaketta. Toinen lomakkeista oli meidän tekemämme (liite 2). Siinä keskityimme stressiin, väsymykseen ja unen laatuun, ja toinen lomakkeista oli yleinen työuupumuksen arvioinnissa käytettävä haastattelulomake B15. Työuupumuslomakkeen arvioi tutkimuksessamme apuna toiminut työterveyspsykologi. Koehenkilöille annettiin myös päiväkirja, joihin merkitään päivän tapahtumat ja aktiivisuudet. Päiväkirjaan merkitään fyysinen aktiivisuus, psyykkisesti kuormittavat tapahtumat, palauttavat tapahtumat (esimerkiksi päiväunet tai tauko), unen kesto sekä laatu ja mahdolliset lääkitykset sekä alkoholin käyttö. Päiväkirjaa voidaan käyttää apuna analysoitaessa sykevälivaihtelukäyrää. Haastattelulomakkeissa tutkimushenkilö arvioi omaa stressin tasoaan, jonka avulla tutkimme, kuinka hyvin muut tutkimustulokset vastaavat henkilön kokemaa stressitilaa. Kaikki lomakkeet ovat tietosuojamateriaalia, joten jokaiselle tutkimushenkilölle on keksitty oma koodi, jolloin kaikki henkilötiedot pysyvät nimettömänä tutkimuksen ajan.

Haastattelujen jälkeen sykemittariin syötettiin tutkimushenkilön syntymäaika, sukupuoli, pituus ja paino. Sykevyön elektrodipinnat kostutettiin johtokykyä parantavalla geelillä ja tarkistettiin, että elektrodipinnat ovat tiukasti ihoa vasten. Sykemittari asetettiin päälle ja kerrattiin mittarin käyttöohjeet (liite 3). Tärkeimpänä ohjeena oli, ettei sykevyötä irroteta edes suihkussa. Sykemittarin kello tulee ottaa pois, mutta pitää se tarpeeksi lähellä signaalin säilyvyyden takaamiseksi. Ohjeissa on myös uudelleenkäynnistysohjeet vaihe vaiheelta, jos mittaus sattuu katkeamaan kesken tutkimuksen.

5.3 Näytteiden analysointi

Verinäytteet kortisolimääritystä varten otettiin seerumigeeli-näyteputkiin. Näytteen annettiin hyytyä vähintään puoli tuntia ennen sentrifugointia. Seeruminäytteet sentrifugoitettiin 15 minuuttia 3000 rpm:n (rounds per minute) kierrosnopeudella. Sentrifugoinnin jälkeen seerumi eroteltiin puhtaaseen putkeen ja pakastettiin analysointipäivään asti. Käytimme Salivette-näyteputkia sylkinäytteen keräyksessä. Opastimme tutkimushenkilöt ottamaan sylkinäytteen, jotta he osaisivat ottaa sen itsenäisesti. Sylkinäytteet sentrifugoitettiin kierrosnopeudella 2290 rpm kahden minuutin ajan ja pakastettiin.

Syljen ja seerumin kortisolimääritykset

Syljen ja seerumin kortisolimääritykset tehtiin radioimmunoanalyysimenetelmällä (RIA) Oulun Yliopiston biolääketieteen laitoksen fysiologian osastolla Multigamma II, 1260 Gamma Counterilla, käyttäen Orionin valmistamaa tutkimuskittiä (liite 6). Radioimmunoanalyysi on herkkä ja spesifinen menetelmä, jossa antigeeni tai vasta-aine on leimattu radioaktiivisella merkkiaineella. Kun näyte ja reagenssi yhdistetään, määritettävä yhdiste eli leimaamaton antigeeni ja vakiomääräinen leimattu antigeeni kilpailevat yhtä aikaa sitoutumisesta rajoitettuun määrään vasta-ainetta, joka on sidottuna kiinteään faasiin, esimerkiksi putken pintaan. Reaktion jälkeen vasta-aineeseen sitoutunut leima määritetään ja käytetään leimaamattoman yhdisteen pitoisuuden laskemiseen. Radioimmunoanalyysin käyttö on vähentynyt, sillä markkinoille on tullut uusia menetelmiä, kuten ELISA (entsyymi-immunologinen määrittäminen). RIA:ssa käytettävää radioaktiivista leimaa pidetään terveydelle haitallisena, mutta sillä on kuitenkin hyvätkin puolensa, koska se on tarkka ja herkkä sekä isotooppi on helppo liittää käytettävään antigeeniin tai vasta-aineeseen. Syntyvä signaali voidaan mitata ilman tarkkaa optimointia, eikä se ole herkkä häiritseville tekijöille. (Halonen 2004, 90–94.)

Orion Diagnostica Spectria Cortisol RIA tutkimuskittiä käyttäen voidaan määrittää radioimmunoanalyysillä kortisolin pitoisuutta seerumista, virtsasta ja syljestä. Tutkimuskittiin kuuluvissa koeputkissa on valmiiksi sidottuna jäniksen polyklonaalisia anti-kortisoli vasta-aineita, ja reagenssissa on valmiiksi ¹²⁵I-leimattua (jodi leimattua) kor-

tisolia Tris-puskurissa. Reagenssin radioaktiivisuus on alle 250kBq. Myös kalibraattorit kuuluvat kittiin. (Orion Diagnostica, 4–5.)

Syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden määrittäminen

Syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden määrittäminen tehtiin Salimetricsin tutkimuskitiä käyttäen koulumme PerkinElmer Victor X Multilabel Reader -spektrofotometriä (liite 7). Spektrofotometri on optinen mittaustilaite, joka mittaa absorboitunutta tai transmitoitunutta valoa. Spektrofotometrin toimintaperiaate perustuu Lambert-Beerin lakiin, jonka mukaan valon absorption määrä on suoraan verrannollinen valon aineessa kulke-
maan matkaan ja aineen konsentraatioon liuoksessa. Spektrofotometrillä voidaan mitata valon intensiteettiä halutulla aallonpituudella yleensä UV-alueelta infrapuna-alueelle asti (190–1000 nm) jatkuvasti säädettävän prisman tai hilan avulla. Useat biologiset yhdisteet absorboivat valoa UV-alueella. Spektrofotometriä käytetään biologiassa esimerkiksi nukleiinihappojen ja proteiinien pitoisuuksien määrittämisessä. (Halonen 2004, 67–68; Solunetti, hakupäivä 14.9.2011.)

5.4 Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi

Tutkimuksista saatiin kvantitatiivista tietoa, jota käytimme tutkimusaineistona. Kirjasimme tulokset taulukkomuotoon käyttäen Microsoft Office Excel -taulukko-ohjelmaa. Havainnollistaaksemme tutkimustuloksia, ne on kuvattuina kuvioiden ja kaavioiden avulla. Aineistomme pienuudesta johtuen, emme käyttäneet tilastollisia menetelmiä aineiston analysoinnissa, vaan teimme johtopäätöksiä tekemistämme taulukoista ja kuvioista. Teimme aineistostamme johtopäätöksiä siitä, kuinka hyvin eri tutkimustulokset vastaavat tutkimushenkilöiden kokemaa stressitilaa, sekä siitä toimiiko syljen alfa-amylaasin aktiivisuus pitkäaikaisstressin merkkiaineena yksittäismittauksessa.

6 TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

Tutkimuksemme tarkoituksena on selvittää syljen alfa-amylaasientsyymin merkitys pitkäaikaisstressitilassa. Tavoitteenamme oli selvittää kuinka hyvin syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden mittaus toimisi yksittäisenä, kerran tehtävänä tutkimuksena pitkäaikaisstressin diagnosoinnissa ja miten saamamme syljen alfa-amylaasin, syljen kortisolin, veren kortisolin sekä sykevälivaihtelumittauksen tulokset vastaavat koehenkilön kokemaa stressitilaa

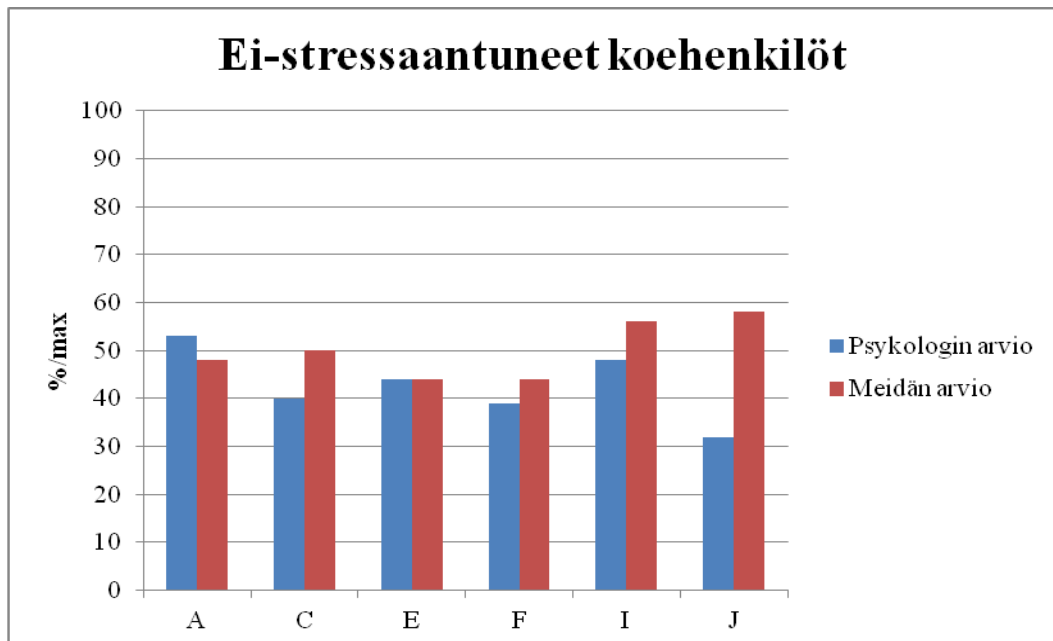
6.1 Tutkimushenkilöiden kokeman stressitilan yhteys tutkimustuloksiin

Haastattelulomakkeet

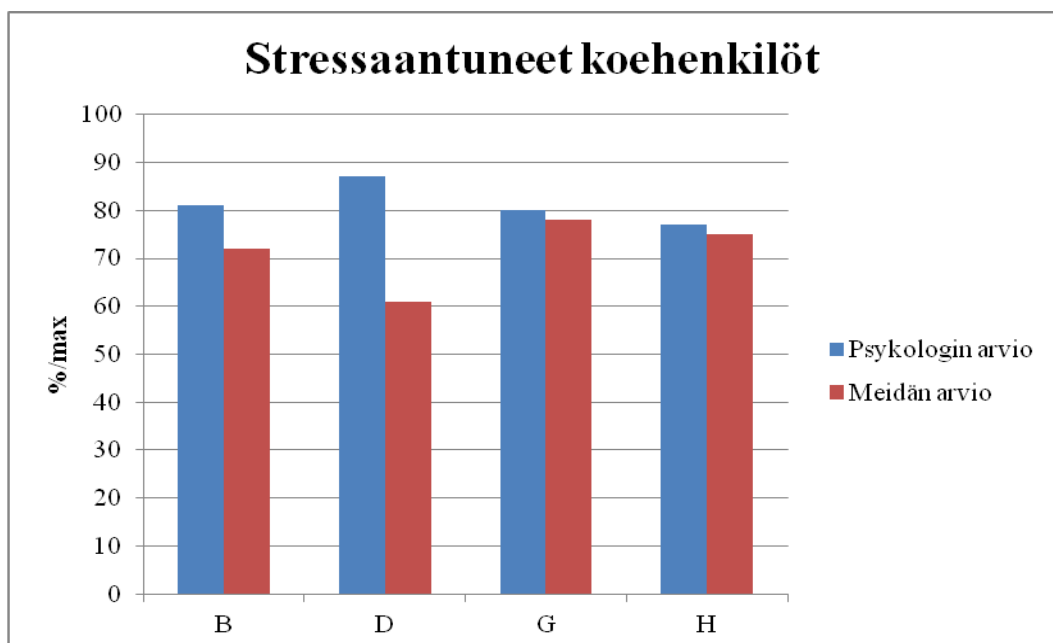
Haimme tutkimukseen henkilöitä, jotka kokivat itsensä stressaantuneiksi. Koehenkilöt täyttivät kaksi haastattelulomaketta, joiden perusteella heidän stressitasonsa arvioitiin. Toinen lomakkeista oli valmis psykologien käyttämä kaavake, jonka perusteella arvioidaan muun muassa työuupumusta ja siihen liittyvää stressiä. Toisen lomakkeen suunnittelimme itse (liite 2). Halusimme lomakkeen kysymyksillä tietoja koehenkilöiden stressitasosta, väsymyksestä ja niiden fyysisistä vaikutuksista. Koehenkilöt arvioivat kokeensa olotilaa numeerisesti asteikolla 1–6. Myös psykologin haastattelulomakkeessa arvioitiin omia tuntemuksia numeerisesti ja muutimme molemmista haastattelulomakkeista saadut tulokset prosenttiluvuksi, joissa 100 % on maksimi stressitaso.

Jaoimme tutkimushenkilöt haastattelulomakkeista saadun informaation perusteella kahteen ryhmään, jotka nimesimme stressaantuneiksi ja ei-stressaantuneiksi. Stressaantuneen henkilön kriteerinä oli, että hänen oma arvio stressitasostaan ylittää 60 %:n rajan. Prosentti on laskettu tekemästämme haastattelulomakkeesta, jossa koehenkilöt arvioivat omaa stressitilaansa. Kuvioissa 2 ja 3 olemme verranneet psykologin arviota omaamme. Molemmilla haastattelulomakkeilla on saatu samankaltaisia tuloksia suurimmassa osas-

sa tapauksista. Haastattelulomakkeilla saadut tulokset kuitenkin kuvaavat vain henkilön omaa subjektiivisesti kokemaa olotilaa.



KUVIO 2: Ei-stressaantuneiden koehenkilöiden stressitason arvio haastattelulomakkeiden perusteella. Kirjaimet viittaavat tutkimushenkilöihin.



KUVIO 3: Stressaantuneiden koehenkilöiden stressitason arvio haastattelulomakkeiden perusteella. Kirjaimet viittaavat tutkimushenkilöihin

Sykevälivaihtelu

Koehenkilöt pitivät sykevälivaihtelua mittaavaa sykemittaria yllään tutkimukseen osallistumisen ajan. Mittari mittasi sykevälivaihtelua sekä unen että valveen aikana, ja mitauspäiväkirjan avulla nämä vaiheet pystyttiin erottamaan toisistaan.

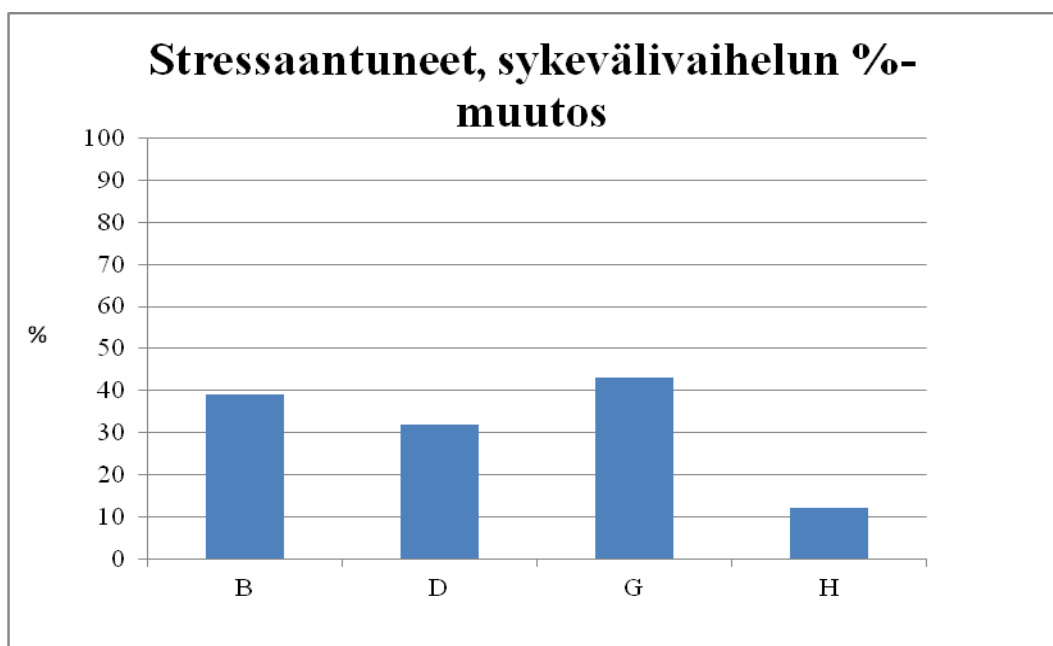
Stressin hallinnan kannalta on tärkeää, että stressitila ei ole jatkuvaa ja palautumista tapahtuu yön aikana. Yö on tärkein palautumisen jakso, mutta myös lyhyet palauttavat hetket päivän aikana auttavat voimavarojen palautumisessa. (Firstbeat 2010, 6.) Palautuminen voidaan havaita sykevälivaihtelun muutoksina. Kasvanut sykevälivaihtelu yön aikana kuvaa elimistön palautumista. (Lindholm 2007, hakupäivä 6.4.2011.)

Vertasimme koehenkilöiden valveen ja unen aikaista sykevälivaihtelua, ja laskimme niiden välisen prosentuaalisen muutoksen. Kuvioissa 4 ja 5 kuvataan stressaantuneen- ja ei-stressaantuneen ryhmän sykevälivaihtelun valveen ja unen välistä prosentuaalista muutosta. Kuten viitekehyksestä tulee ilmi, stressaantuneiden koehenkilöiden sykevälivaihtelun prosentuaalinen muutos valveen ja unen välillä tulisi olla pieni, ja ei-stressaantuneiden koehenkilöiden suuri. Liite 5 on tyypillinen esimerkki sykevälivaihtelukäyrästä.

Sykevälivaihtelun prosentuaaliset muutokset olivat jokseenkin samantasoisia molemmissa ryhmissä. Kummassakin ryhmässä oli havaittavissa eroja yksilöiden välillä. Esimerkkinä poikkeamasta, koehenkilö F on saanut laskennalliseksi tulokseksi haastattelulomakkeestamme 44 %, jonka mukaan hänet on luokiteltu ei-stressaantuneeseen ryhmään. Kuitenkin kuviosta 5 huomaa hänen sykevälivaihtelun prosentuaalisen muutoksen olevan huomattavan matala verrattaessa muihin koehenkilöihin, myös koehenkilöihin stressaantuneiden ryhmässä.



KUVIO 4: Ei-stressaantuneiden koehenkilöiden sykevälivaihtelun prosentuaalinen muutos valveen ja unen välillä.



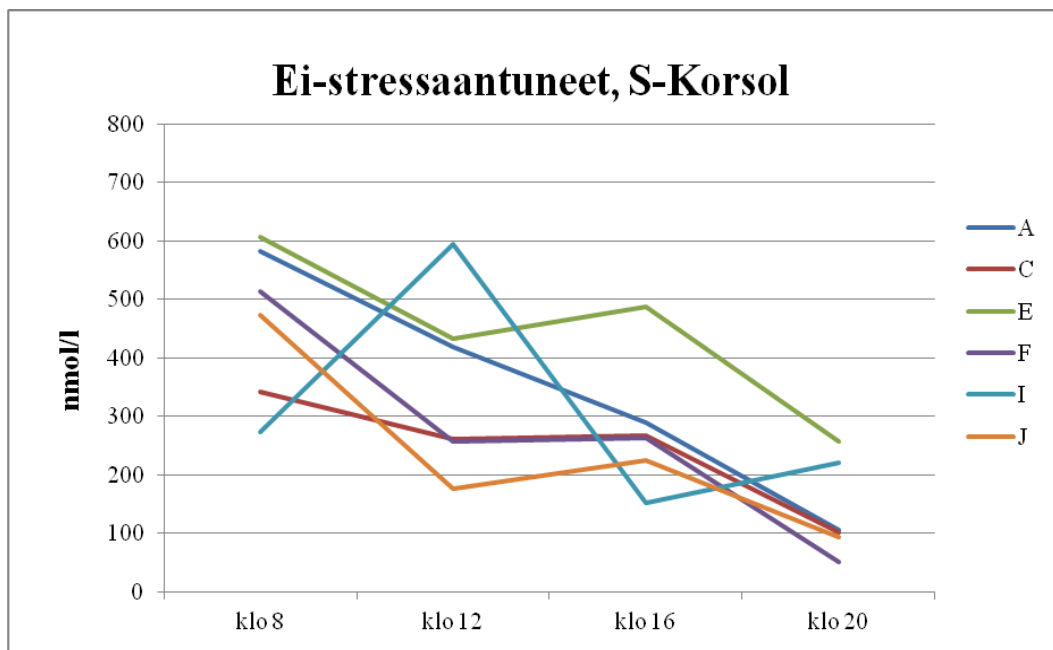
KUVIO 5: Stressaantuneiden koehenkilöiden sykevälivaihtelun prosentuaalinen muutos valveen ja unen välillä.

Seerumin kortisoli

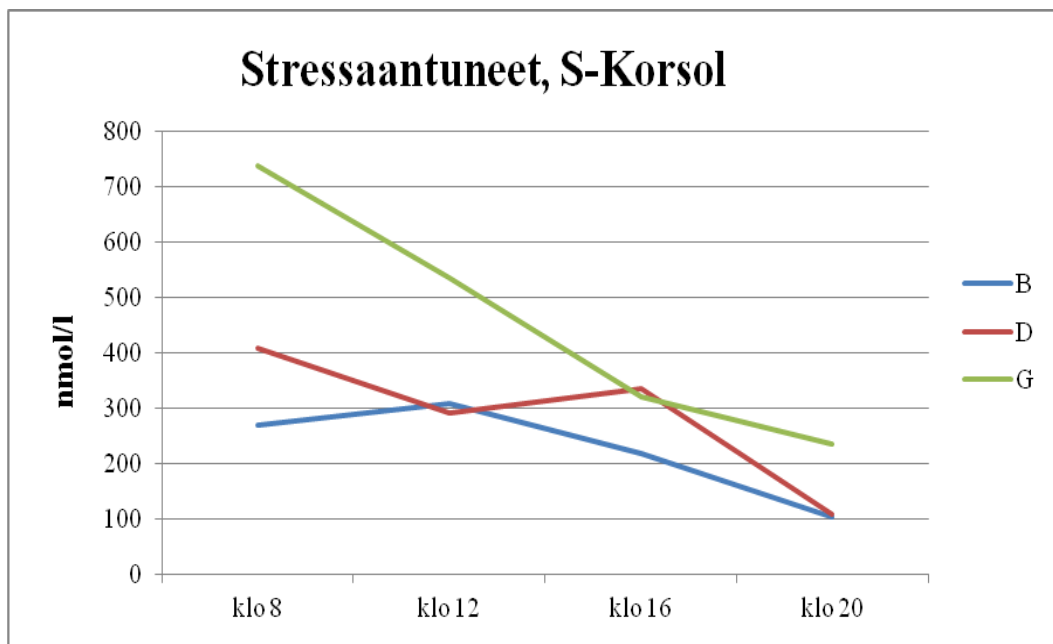
Tutkimuksen aikana koehenkilöiltä otettiin verinäytteet neljä kertaa: klo 12, 16, 20 ja seuraavana aamuna klo 8. Näytteistä määritettiin seerumin kortisoli. Seerumin kortisolin iltapäiväarvot ovat normaalisti noin 25–40 % aamuarvoja alhaisemmat. Stressissä veren kortisoliarvot ovat hieman koholla. (Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri 2010, hakupäivä 6.12.2011). Seerumin kortisolin tasot ovat suurimmillaan varhain aamulla ja pienimmillään myöhään illalla. (Helsingin ja uudenmaan sairaanhoitopiiri 2010, hakupäivä 14.1.2011.) Käytimme Orionin antamia viite-arvoja, joissa aamuarvot ovat 131–642 nmol/l ja iltapäiväarvot 61–429 nmol/l.

Tutkimustuloksia kuvaavissa kuvioissa kello 8.00 tulos on siirretty ensimmäiseksi, jotta tulosten tarkastelu helpottuisi. Näin vuorokausivaihtelun havainnointi helpottuu.

Tarkastellessa kuviota 6, voi huomata, että yhtä poikkeusta lukuun ottamatta (koehenkilö I), ei-stressaantuneen tutkimusryhmän jäsenten seerumin kortisoliarvot noudattavat samankaltaista kaavaa. Aamuarvot ovat korkeimmat, laskevat keskipäivään mennessä, pysyvät suhteellisen tasaisena tai nousevat hieman iltapäivään mennessä, ja laskevat reilusti illaksi. Tämä päivärytmi noudattaa normaalia seerumin kortisoliarvojen vuorokausivaihtelua.



KUVIO 6: Ei-stressaantuneiden seerumin kortisoliarvot. Tarkastelun helpottamiseksi klo 8 tulos siirretty ensimmäiseksi.



KUVIO 7: Stressaantuneiden seerumin kortisoliarvot. Kuviosta puuttuu koehenkilö H:n tulokset, sillä iltanäytettä ei saatu otettua tutkimusryhmästäme riippumattomista syistä.

Kuviossa 7 kuvataan stressaantuneen tutkimusryhmän jäsenten seerumin kortisoliarvoja. Kun verrataan kuvioita 6 ja 7, voi havaita että tutkimusryhmien välillä seerumin kortisoliarvojen päivärytmi on melko samankaltainen. Stressaantuneiden kortisoliarvot ovat aamulla korkeimmillaan ja laskevat illalla matalimmilleen, mikä noudattaa normaalia kortisoliarvojen vuorokausirytmää. Se tapa, kuinka kortisoliarvot laskevat stressaantuneen tutkimusryhmän sisällä, on hieman vaihteleva.

Kuviosta 7 huomaa, että koehenkilö D:n kortisoliarvot noudattavat hyvin samankaltaista vuorokausivaihtelua kuin ei-stressaantuneiden ryhmä. Koehenkilö G:n aamuarvot taas ovat huomattavasti yli viitealueen (>642 nmol/l). Kortisoliarvot laskevat jatkuvasti iltaa kohden, eivätkä arvot pysy tasaisena keskipäivän ja iltapäivän välisenä aikana. Koehenkilö B:n kortisoliarvoja tarkastellessa voi huomata, että hänen keskipäiväarvonsa on itse asiassa korkeampi kuin aamuarvo, vaikka normaalisti aamuarvo on korkein. Ero on pieni, mutta kuitenkin poikkeava normaalista vuorokausirytmistä, joka on havaittavissa suurimmalla osalla tutkimushenkilöistämme.

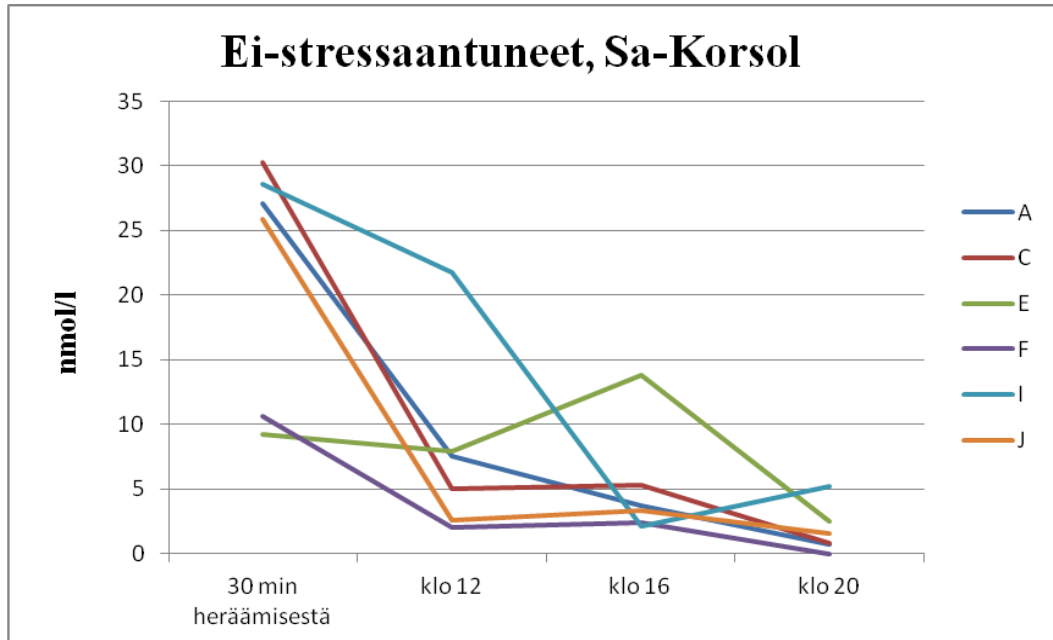
Syljen kortisoli

Koehenkilöt keräsivät sylkinäytteitä neljä kertaa tutkimuksen ajan: klo 12, 16, 20 ja seuraavana aamuna puoli tuntia heräämisen jälkeen. Kuten viitekehyksessä todetaan, matalat kortisoliarvot aamulla ovat yhteydessä aamu-unisuuteen, edeltävän päivän uupumiseen ja huonoksi arvioituun terveyden tilaan sekä korkeat ilta-arvot liittyvät stressioireisiin (Dahlgren ym. 2009). Stressaantuneen- ja ei-stressaantuneen ryhmän välillä siis tulisi olla eroja.

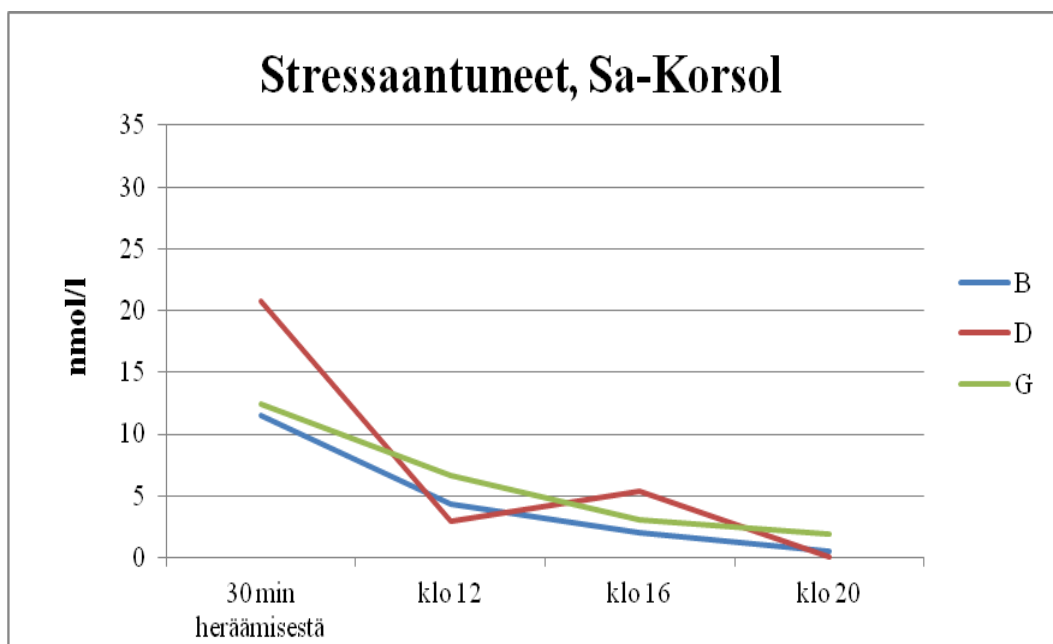
Vertasimme syljen kortisolituloksia Orionin antamiin viiteväleihin, joissa aamuarvot ovat 6,2–38,1 nmol/l ja iltapäiväarvot 0,6–4,9 nmol/l.

Stressaantuneiden ja ei-stressaantuneiden syljen kortisoliarvoilla ei ollut huomattavia eroja keskenään. Tarkastellessa kuvioita 8 ja 9, huomaa, että ryhmien väliset tulokset ovat keskenään hyvin samankaltaisia. Suurimmalla osalla tutkimushenkilöistä syljen kortisolipitoisuus on korkeimmillaan aamulla 30 minuuttia heräämisestä ja laskee tasaisesti iltaa kohti. Joillakin henkilöillä kortisoliarvot poikkeavat kuitenkin vuorokausirytmistä.

mistä. Esimerkiksi tutkimushenkilön E aamuarvo ei ole päivän korkein, vaan se nousee korkeimmilleen vasta iltopäivällä. Kaikki tutkimushenkilö E:n syljen kortisoliarvot ovat kuitenkin viiteväleissä.



KUVIO 8: Ei-stressaantuneiden syljen kortisoliarvot



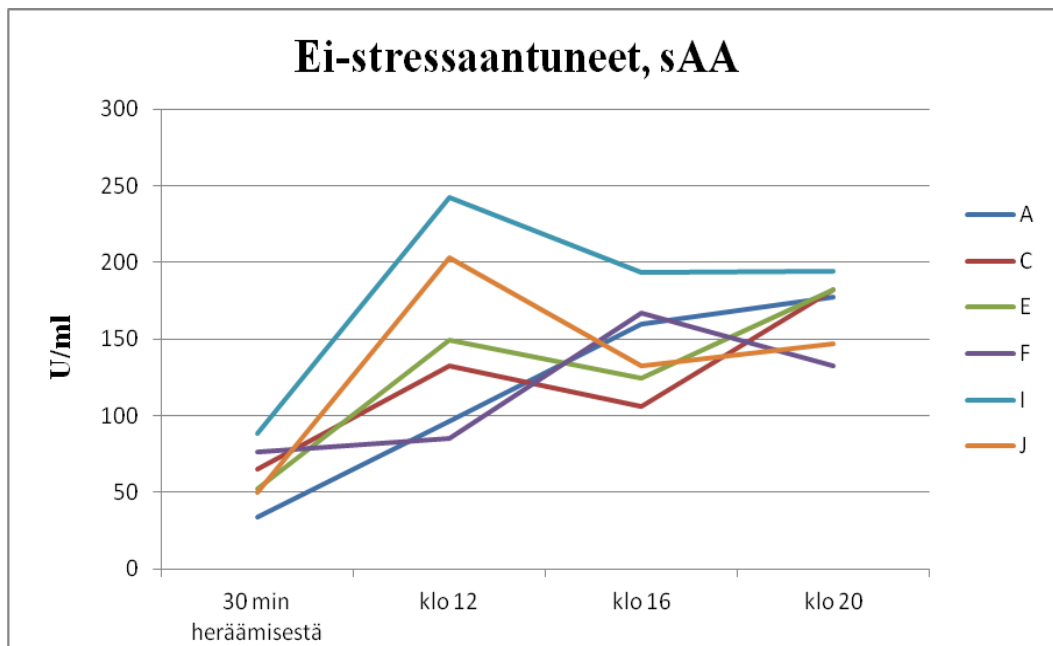
KUVIO 9: Stressaantuneiden syljen kortisoliarvot. Kuvioista puuttuu koehenkilö H:n tulokset, sillä iltanäytettä ei saatu otettua tutkimusryhmästämmme riippumattomista syistä.

Syljen alfa-amylaasi

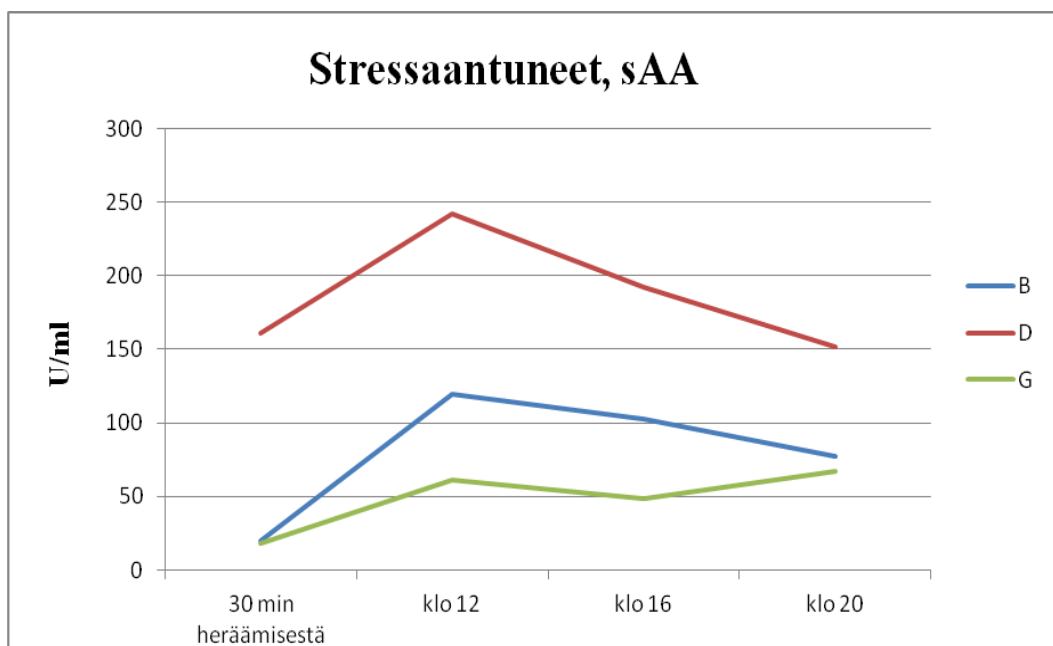
Kuten jo viitekehyksessä kerrotaan, tutkimuksissa on suositeltu ottamaan sylkinäytteet useaan kertaan päivässä, tiettyihin kellonaikoihin, jotta syljen alfa-amylaasin aktiivisuudesta saadaan kokonaisvaltainen kuva. Syljen alfa-amylaasitaso on matalimmillaan heti herätessä ja se kohoaa pitkin päivää. (Nater & Rohleder 2009b). Tutkimushenkilöt ottivat sylkinäytteet kello 12, 16, 20 ja seuraavana aamuna puoli tuntia heräämisen jälkeen ennen hampaiden pesua ja aamupalaa. Teimme syljen alfa-amylaasin aktiivisuuden määrittäykset Salimetricsin tutkimuskitillä, jonka työohjeessa annettiin viiteväliksi 3,1–423,1 U/ml.

Vertaillen kuvioita 10 ja 11 huomataan, että stressaantuneiden ja ei-stressaantuneiden koehenkilöiden tulosten välillä ei ole huomattavia eroja. Kaikilla koehenkilöillä syljen alfa-amylaasiaktiivisuus on aamulla matalimmillaan ja nousee keskipäivään mennessä. Keskipäivän jälkeen tutkimustulokset eivät noudata yhdenmukaista kaavaa ja yksilölliset erot ovat suuria. Kaikki tutkimustulokset ovat kuitenkin viiteväleissä.

Esimerkiksi koehenkilö A:n syljen alfa-amylaasiaktiivisuus nousee tasaisesti pitkin päivää aina iltaan asti. Muilla koehenkilöillä alfa-amylasiaktiivisuus nousee keskipäivään ja laskee iltapäivään mennessä. Osalla arvot nousevat vielä iltaan mennessä, ja osalla arvot laskevat.



KUVIO 10: Ei-stressaantuneiden alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus syljessä.



KUVIO 11: Stressaantuneiden alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus syljessä. Kuvioista puuttuu koehenkilö H:n tulokset, sillä iltanäytettä ei saatu otettua tutkimusryhmästämme riippumattomista syistä.

Johtopäätökset

Arvioimme tutkimushenkilöiden stressitilaa heidän täyttämien haastattelulomakkeiden avulla, ja vertasimme veren ja syljen kortisolipitoisuutta, syljen alfaamylaasiaktiivisuutta sekä sykevälivaihtelua koehenkilöiden kokemaan stressitilaan.

Oletuksenamme oli, että mitä stressaantuneemmaksi ihminen tuntee itsensä, sitä huonompi palautuminen yön aikana tapahtuu. Tämän vuoksi oletimme, että stressaantuneiden henkilöiden sykevälivaihtelun prosentuaalinen muutos valveen ja unen välillä on pieni, ja ei-stressaantuneiden suuri. Tarkastelimme sykevälivaihtelun muutosta jälleen sen perusteella, kuinka stressaantuneeksi koehenkilöt olivat itsensä arvioineet. Kuvioista 4 ja 5 huomaa, että sykevälivaihtelumittaustulokset ja niissä havaitut erot eivät ole tilastollisesti merkittäviä. Sykevälivaihtelun prosentuaaliset muutokset olivat jokseenkin samantasoisia molemmissa ryhmissä, kuitenkin ei-stressaantuneiden ryhmässä sykevälivaihtelun prosentuaalisen muutoksen keskiarvo valveen ja unen välillä oli 36 % kun se stressaantuneiden ryhmässä oli 31 %. Kummassakin ryhmässä oli havaittavissa huomattavia eroja yksilöiden välillä, joka ei tue oletustamme siitä, että ryhmien tulokset olisivat toisistaan selvästi poikkeavia.

Tuloksia tarkastellessa on otettava huomioon, että sykevälivaihtelun mittaus kesti ainoastaan yhden vuorokauden. Luultavasti sykevälivaihtelumittausta tulisi jatkaa useamman päivän ajan, jotta saataisiin tarkempaa tietoa henkilöiden sykevälivaihtelusta ja sen muutoksista. Sykevälivaihtelu voi olla hyvin vuorokausikohtaista, eikä yhden vuorokauden mittaus välttämättä anna siitä riittävän kattavaa käsitystä.

Tuloksiemme perusteella emme pysty sanomaan vastaako veren kortisoliarvot koehenkilöidemme kokemaa stressitilaa. Kuvioista 7 huomaa, että osalla stressaantuneista koehenkilöistä kortisoliarvot olivat poikkeavia viitealueesta tai normaalista vuorokausirytmistä, mutta tutkimusjoukkomme suppeudesta johtuen emme voi yksiselitteisesti tehdä tuloksistamme mitään johtopäätöksiä. Emme lähde epäilemään ilmeisen yleisesti todettua faktaa siitä, että seerumin kortisoli toimii stressin merkkiaineena. Uskoisimme sen vaativan pidempää mittausaikaa, jotta saataisiin yksiselitteisempiä tuloksia.

Oletimme, että stressaantuneiden syljen kortisolin aamuarvot olisivat matalammat ja iltapäiväarvot korkeammat kuin ei-stressaantuneiden arvot. Oletimme myös, että stressaantuneiden arvot olisivat viiteväleistä poikkeavat. Tulokset eivät olleet oletuksiemme mukaisia, sillä kaikki tulokset ovat viiteväleissä, sekä stressaantuneiden aamuarvot eivät ole matalammat eivätkä ilta-arvot korkeammat kuin ei-stressaantuneilla. Tuloksemme ovat päinvastaisia oletuksiemme kanssa.

Näiden tutkimustulosten perusteella syljen kortisoliarvot eivät kerro pitkäaikaisstressin tasosta. Näin ollen emme osaa sanoa vastaako syljen kortisoliarvot henkilön kokemaa stressitilaa. Tutkimustuloksemme eivät ole yhdenmukaisia Dahlgrenin tutkimusryhmän (2009) tulosten kanssa, joiden mukaan uupuminen ja stressi aiheuttavat matalia aamuarvoja ja korkeita ilta-arvoja.

Oletimme, että syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus on matalimmillaan aamulla ja nousee päivän aikana. Kuten viitekehyksessä mainitaan, stressin on todettu aiheuttavan kohonneita arvoja, joten oletimme stressaantuneiden koehenkilöiden tulosten poikkeavan ei-stressaantuneiden tuloksista. Vertaillen kuvioita 10 ja 11 keskenään huomataan, että stressaantuneiden ja ei-stressaantuneiden ryhmien välillä tuloksissa ei ole suuria eroja. Yksilöiden välillä on kuitenkin havaittavissa runsaasti vaihtelua, esimerkiksi vuorokausirytmisissä. Kuviosta 11, stressaantuneiden koehenkilöiden ryhmässä voi huomata tulosten noudattavan laskevaa kaavaa. Kahdella kolmesta stressaantuneesta koehenkilöstä syljen alfa-amylaasiaktiivisuus nousee aamusta keskipäivään, ja laskee tasaisesti keskipäivästä iltaan, päinvastoin kuin normaali vuorokausirytmä. Koehenkilöiden vähäisen määrän ja lyhyen tutkimusajan takia, emme voi sanoa johtuvatko nämä muutokset stressistä vai yksilöllisestä vaihtelusta.

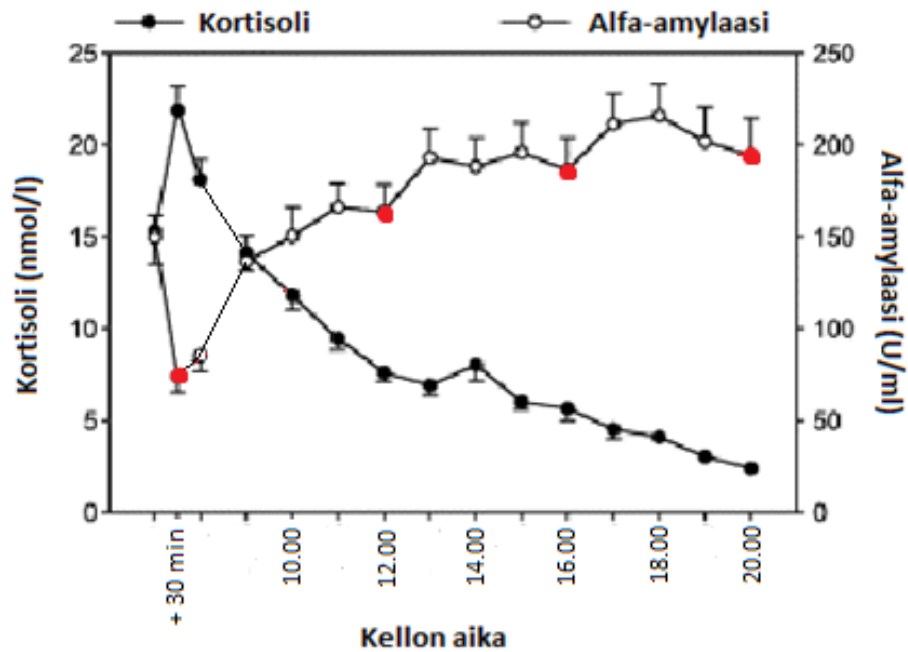
Huomattavasti yksilölliset erot tuloksissa eivät tue oletustamme syljen alfa-amylaasiaktiivisuuden käyttäytymisestä, joten emme osaa sanoa kuvaavatko tulokset tutkimushenkilöidemme kokemaa stressitilaa. Lyhyestä tutkimusajasta johtuen emme mielestämme saaneet tarpeeksi analysoitavaa aineistoa. Syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuutta tulisi mitata pitemmällä aikavälillä, jotta saataisiin luotettavaa tietoa alfa-amylaasiaktiivisuuden yhteydestä pitkäaikaisstressiin ja siitä, kuinka suurta yksilöllinen vaihtelu todellisuudessa on.

Stressin kokeminen on hyvin yksilöllistä. Koehenkilömme arvioivat stressitilaansa subjektiivisesti haastattelulomakkeiden avulla, ja ainakaan tällä subjektiivisesti arvioidulla stressillä ei vaikuta olevan suoraa yhteyttä käyttämiimme stressin mittareihin. Toisen henkilön objektiivinen stressin arviointi on hyvin hankalaa, koska ihmiset käsittelevät stressiä eri tavoin. Tämän vuoksi henkilön itsensä tekemä arvio stressistään on mielestämme luotettavin.

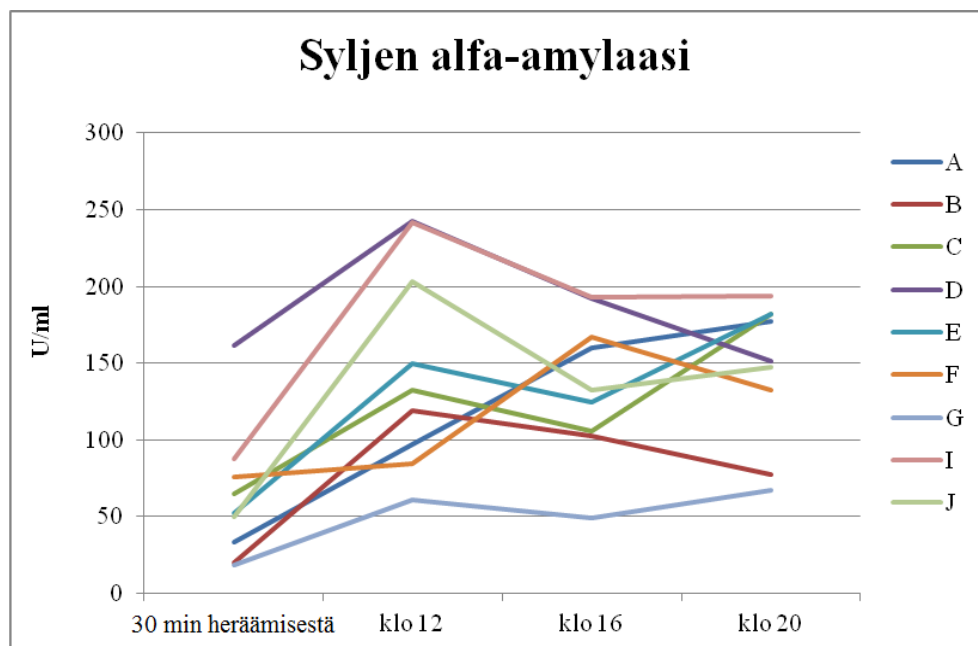
6.2 Syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuusmittaus pitkäaikaistressin diagnosoinnissa

Kehitteillä on vieritestejä syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden mittaamiseen, joiden yksi käyttösovellus voisi olla pitkäaikaistressin toteaminen nopeasti esimerkiksi työterveyslääkärin vastaanotolla. Jos pitkäkestoinen psykososiaalinen stressi voitaisiin todeta yhdellä yksinkertaisella testillä, voitaisiin välttää pitkiä ja kalliita tutkimuksia joi- ta käytetään stressin aiheuttamien oireiden tutkimiseen.

Opinnäytetyötämme tehdessä kaikki aiheeseen liittyvät saatavilla olevat tutkimukset käsittelevät syljen alfa-amylaasin yhteyttä akuuttiin stressiin eikä tutkimustuloksia syljen alfa-amylaasin yhteydestä pitkäaikaistressiin ole saatavissa. Syljen alfa-amylaasientsyymin toimintaa itsessään on kuitenkin tutkittu runsaasti, jonka pohjalta on voitu määrittää muun muassa entsyymin vuorokausirytm.



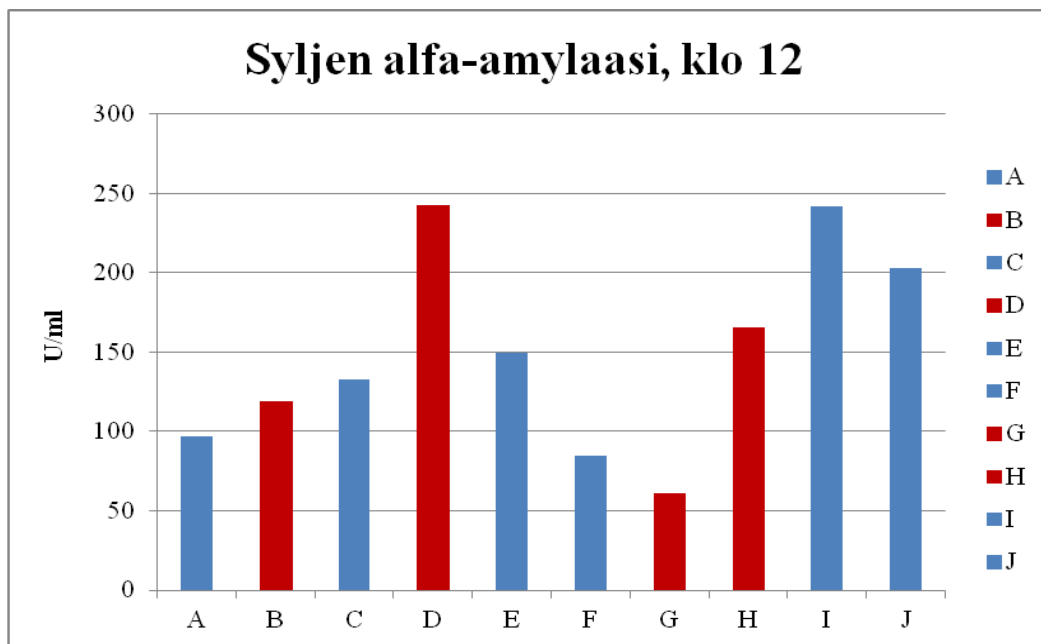
KUVIO 12: Syljen alfa-amylaasin ja kortisolin vuorokausirytm. (Mukaillen Nater & Rohleder. 2009a) Kuvioon merkitty meidän käyttämämme mittausajat punaisella.



KUVIO 13: Saamamme syljen alfa-amylaasiaktiivisuuden tulokset, klo 8 tulos siirretty ensimmäiseksi, jotta vertailukelpoinen kuvion 12 kanssa. Kuvioista puuttuu koehenkilö H:n tulokset, sillä iltanäytettä ei saatu otettua tutkimusryhmästä riippumattomista syistä.

Vertailtaessa kuvioita 12 ja 13 keskenään, huomataan, että saamistamme tuloksista suurin osa ei ole samankaltaisia Naterin ja Rohlederin (2009b) havaitseman vuorokausivaihtelun kanssa. Tämä ilmiö on kuitenkin havaittavissa sekä stressaantuneiden että ei-stressaantuneiden koehenkilöiden ryhmissä. Tämän vuoksi emme voi päätellä, että poikkeavuudet vuorokausirytmisissä olisivat yhteydessä kohonneeseen stressitasoon.

Havainnollistaaksemme yksilöiden välisiä eroja, kuviossa 14 kuvataan koehenkilöiden syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus kello 12. Kuviota tarkastellessa huomaa, että stressaantuneiden ryhmän koehenkilöiden tulokset ovat hyvin toisistaan poikkeavia, kuten myös tulokset ei-stressaantuneiden ryhmän sisällä. Tulokset eivät myöskään poikkea toisistaan huomattavasti ryhmien välillä minään kellon aikana.



KUVIO 14: Syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus klo 12 päivällä. Stressaantuneet koehenkilöt kuvattu punaisella värillä.

Johtopäätökset

Koska kaikki syljen alfa-amylaasientsyymien aktiivisuuteen liittyvät saatavilla olevat tutkimukset käsittelevät alfa-amylaasin yhteyttä akuuttiin stressiin eikä tutkimustuloksia alfa-amylaasin yhteydestä pitkäaikaistressiin ole saatavissa, emme voi suoraan pohjata saamiemme tutkimustuloksia aiempiin tutkimuksiin.

Nater ja Rohleder (2009b) ovat havainneet tutkimuksessaan syljen alfa-amylaasiaktiivisuudessa vuorokausivaihtelua. Verrattaessa meidän saamia tuloksia tähän vuorokausirytmiiin (kuvio 12), huomataan että saamistamme tuloksista suurin osa ei noudata tätä rytmiiä. Koska eroavuuksia vuorokausirytmiiissä on myös ei-stressaantuneilla koehenkilöillä, emme voi päätellä, että poikkeavuudet vuorokausirytmiiissä olisivat yhteydessä kohonneeseen stressitasoon.

Oletimme, että stressaantuneimman koehenkilön syljen alfa-amylaasientsyymien aktiivisuusarvot olisivat korkeammat kuin vähiten stressaantuneen koehenkilön. Koehenkilöiden alfa-amylaasitason yksilölliset erot tulee ottaa huomioon tuloksia tarkastellessa, sillä erot ovat selkeitä ja huomattavia.

Alfa-amylaasientsyymien aktiivisuutta syljessä tulisi tutkia laajemmalla tutkimusjoukolla ja pitemmällä mittausajalla, jotta tuloksista voitaisiin päätellä onko entsyymien aktiivisuus syljessä yhteydessä pitkäaikaistressiin. Tutkimustuloksiamme tarkastellessa tulee muistaa, että tutkimusjoukkomme on hyvin pieni, mutta saamiemme tulosten perusteella väittäisimme, että syljen alfa-amylaasientsyymien aktiivisuuden mittaus ei toimi kerran tehtävänä yksittäismittauksena pitkäaikaistressin diagnosoinnissa.

7 POHDINTA

Alkuperäinen aiheemme oli osallistua syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuutta mittaavan vieritestin kehitykseen. Vieritestillä olisimme tutkineet onko syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuus koholla pitkäaikaisessa stressissä, ja voiko vieritestiä käyttää luotettavaan syljen alfa-amylaasientsyymin aktiivisuuden määrittämiseen. Vieritesti ei kuitenkaan valmistunut ajoissa, joten opinnäytetyön aiheemme muuttui alkuperäisestä suunnitelmasta vieritestin osalta. Aiheemme on kuitenkin sama syljen alfa-amylaasin ja stressin osalta.

Opinnäytetyömme aihe on ajankohtainen, sillä syljen alfa-amylaasientsyymiä on viime aikoina tutkittu paljon. Tutkimuksia on tehty siitä, voiko syljen alfa-amylaasin pitoisuutta käyttää stressin diagnosoimiseksi. Vieläkään ei ole täysin ymmärretty millainen yhteys syljen alfa-amylaasientsyymillä, autonomisella hermostolla ja stressillä on. Tähtöme oli tuottaa tuloksia siitä, voiko alfa-amylaasientsyymien pitoisuus syljessä kertoa elimistön stressitilasta. Toivomme, että tuloksistamme olisi hyötyä tulevissa tutkimuksissa, jotka liittyvät syljen alfa-amylaasin ja stressin yhteyteen.

Pärimme parantamaan tutkimuksen luotettavuutta suunnittelemalla tutkimuksen kulun perusteellisesti. Suunnittelimme näytteenottoaikataulut siten, että saisimme kokonaisvaltaisen ja luotettavan käsityksen sekä kortisolin että alfa-amylaasiaktiivisuuden vuorokausivaihtelusta. Pyrimme parantamaan tulosten luotettavuutta ohjaamalla koehenkilöt tutkimukseen ja näytteenottoon preanalyttisten ohjeiden avulla, sekä vakioimme näytteenoton viitekehityksessä kuvatuin tavoin. Määrittäessä näytteitä, käytimme asettisia työskentelytapoja kontaminaation välttämiseksi. Käytimme asianmukaisia kalibroituja pipettejä, jotta päästiin tarkkoihin pipetointituloksiin. Tulosten luotettavuus varmistettiin kontrollinäytteitä käyttämällä ja kaikista näytteistä tehtiin rinnakkaismääritykset. Näytteet, joiden tulokset poikkesivat huomattavasti viiteväleistä tai rinnakkaismäärityksistä, analysoimme uudestaan. Tutkimuksemme on luotettava, sillä se on täysin toistettavissa.

Tutkimuksessa kuitenkin oli tekijöitä, jotka vaikuttivat tutkimustulosten luotettavuuteen. Stressaantuneiden tutkimushenkilöiden hankkiminen oli hankalaa, koska tutkimusajat olivat vaativia ja tutkimushenkilöiden oli tultava näytteenottoon koulullemme neljän tunnin välein. Koska tutkimushenkilöiden saanti oli hankalaa ja kriteerit tutkimukseen pääsemiseksi olivat tiukat, jouduimme joustamaan niissä. Näin ollen otimme tutkimukseen myös henkilöitä, jotka eivät kokeneet itseään erityisen stressaantuneeksi.

Tavoitteenamme oli saada kymmenen stressaantunutta koehenkilöä, mikä jälkepäin osoittautui liian pieneksi joukoksi. Näin suppealla joukolla ja lyhyellä mittausajalla, emme mielestämme saaneet tarpeeksi tutkimusaineistoa, jolla olisimme voineet saada riittävän kattavia tuloksia. Tekemällä vastaava tutkimus laajemmalla tutkimusjoukolla ja pitemmällä mittausajalla voitaisiin saada luotettavampaa tietoa syljen alfa-amylaasin yhteydestä pitkäaikaisstressiin.

Vaikka opinnäytetyömme aihe muuttui alkuperäisestä, mielestämme onnistuimme tutkimuksen tekemisessä hyvin. Suunnittelimme tarkasti käytännön osiot, johon kuuluivat näytteenotto, näytteiden esikäsittely, säilytys ja analysointi. Loppuraportin kirjoittamiseen meni enemmän aikaa, kuin suunnittelimme. Mielestämme opimme opinnäytetyön tekemisessä yhteistoiminnallisuutta. Teimme opinnäytetyötä kolmen hengen ryhmässä, ja aikataulujen sovittaminen yhteen oli melko helppoa.

Henkilökohtaisena tavoitteenamme oli kehittää ammattitaitoa niin asiakaspalvelussa kuin aineiston analysoinnissakin, ja koemme onnistuneemme hyvin näissä tavoitteissa, sillä tietotaitomme on syventynyt huomattavasti. Tutkimukseen osallistuminen oli mielenkiintoista ja hyödyllistä bioanalyytikon ammatin kannalta, sillä ammattiimme voi joskus kuulua myös uuden analyysin testausta. Opinnäytetyö edisti ammatillista kasvua, sillä tämän tutkimuksen ansiosta osaamme ammatissamme suhtautua kriittisesti uusiin testeihin ja menetelmiin.

Vaikka tutkimustuloksemme eivät olleet odotustemme mukaisia, emmekä löytäneet yhteyttä syljen alfa-amylaasiaktiivisuuden ja tutkimushenkilöiden kokeman stressin välillä, koemme silti onnistuneen opinnäytetyössämme. Tutkimuksemme kuitenkin todisti sen, että syljen alfa-amylaasiaktiivisuuden mittaus ei toimi kerran tehtävänä yksittäis-

mittauksena pitkäaikaisstressin diagnosoinnissa, vaan siihen tarvitaan pidempi mittausaika. Uskomme, että tämä tutkimus antaa pohjaa seuraaville tutkimuksille, joissa tutkitaan pitkäaikaisstressiä eri fysiologisten menetelmien avulla.

Opinnäytetyö on kokonaisuudessaan ollut hyvin opettavainen kokemus. Tutkimustyön tekeminen oli meille kaikille uusi kokemus, joten loppuraportin kirjoittaminen oli välillä haastavaa. Vaikeimmaksi koimme tutkimustulosten analysoinnin ja raportoinnin, sillä meidän tuloksemme eivät olleet sellaisia mitä oletimme saavamme. Olemme lopputulokseen tyytyväisiä ja haluamme kiittää kaikkia tutkimuksessa apuna olleita henkilöitä.

LÄHTEET

Acharya, U. R., Joseph, K. P., Kannathal, N., Lim, C. M. & Suri J. S. 2006. Heart rate variability: a review. *Med Bio EngComput* (44) 1031–1051.

Aldridge, S. 2001. *Masennus ja stressi*. Helsinki: Art House Oy.

Allwood, M., Granger, D., Handwerger, K., Kivlighan, K. & Stroud, L. 2011. Direct and moderating links of salivary alpha-amylase and cortisol stress-reactivity to youth behavioral and emotional adjustment. *Biological Psychology* (88) 57–64.

Amend, J., Arnold, M. & Mundy, B. 1993. *General, organic and biological chemistry*. 2. painos. United States of America: Saunders College Publishing.

Antoniadis, A., Barthélémy, J., Bourin, E., Duverney, D., Garet, M., Gaspoz, J., Lacour, J., Pichot, V. & Roche, F. 2002. Quantification of cumulated physical fatigue at the workplace. *PflügersArchiv - European Journal of Physiology* (445) 267–272.

Berger, S., Ehler, U., Gaab, J., Jud, A., Kirschbaum, C., Nater, U & Rohleder, N. 2005. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *International Journal of Psychophysiology* (55) 333–342.

Bosch, J., de Geus, E., Proctor, G. & Veerman, E. 2011. α -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology* (36) 449–453.

Dahlgren, A., Kecklund, G., Theorell, T. & Åkerstedt, T. 2009. Day-to-day variation in saliva cortisol - Relation with sleep, stress and self-rated health. *Biological Psychology* (2) 149–155.

Ehlert, U., Florin, L., Koller, M., La Marca, R., Langhans, W., Moses, A. & Nater, U. 2006. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity – associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology* (31) 49–58.

Elashoff, D., Robles, T., Shetty, V., Yamaguchi, M. & Zigler, C. 2011. Developmental validation of a point-of-care, salivary α -amylase biosensor. *Psychoneuroendocrinology* (36) 193–199.

Firstbeat. 2010. Käytännön työkalu hyvinvoinnin ammattilaiselle. Hakupäivä 1.3.2011.
<http://www.firstbeat.fi/fi/tyo-ja-hyvinvointi/hyvinvointianalyysin-esittely>

Firstbeat. 2010. Hyvinvointianalyysi, Sykevälimittauksella henkistä ja fyysistä hyvinvointia. Asiantuntijanopas, versio 1-0.

Garza, D. & Becan-McBride, K. 2005. *Phlebotomy handbook: blood collection essentials*. 7. painos. Pearson Education Ltd.

Halonen, T. 2004. Fotometriset menetelmät. Teoksessa I. Penttilä (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Porvoo: WS Bookwell Oy. 90–94.

Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien perusteet. Teoksessa I. Penttilä (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Porvoo: WS Bookwell Oy. 67–68.

He, M., Jiang, D., Qiu, Y., Tong, S. & Zhu, Y. 2009. Long-range correlations in heart rate variability during computer-mouse work under time pressure. *Physica A*. (388) 1527–1534.

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. 2006. Stressi. Hakupäivä 14.1.2011.
<http://www.hus.fi/default.asp?path=1,32,818,1733,3727,7661>

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. 2011. Syljen kortisoli. Hakupäivä 7.9.2011.
<http://www.huslab.fi/ohjekirja/20023.html>

Hiltunen, E., Holmberg, P., Kaikkonen, M., Lindblom-Ylänne, S. & Niensted, W. 2003. Galenos, ihmiselimistö kohtaa ympäristön. 4. painos. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Holum, J. 1997. Fundamentals of general, organic and biological chemistry. 6. painos. United States of America: John Wiley & Sons, Inc.

Joutsu-Korhonen, L. 2010. Preanalytiikka luo perustan tutkimusten luotettavuudelle. Labquality Oy. Moodi (4) 206.

Kerttula, T. 1999. Effects of catecholamines and phosphodiesterase inhibitors on arachidonic acid metabolism in man. Hakupäivä 14.1.2011.

<http://acta.uta.fi/teos.php?id=1669>

Kouri, T., Malminiemi, O. & Pohjanvaara, S. 2003. Preanalytiikka alueellisessa laboratoriotoiminnassa. Suomen lääkrilehti (4) 399–403.

Lönnqvist, J. 2009. Stressi ja depressio. Duodecim. Hakupäivä 4.1.2012.

http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=seh00020

Mattila, A. 2010. Tietoa potilaalle: Stressi. Hakupäivä 14.1.2010.

http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_haku=stressi

Mäkitalo, O. & Vainio, E. 2008. Vakioitu näytteenotto edistää potilasturvallisuutta. Sairaanhoitaja (10) 20–23, 29.

Nater, U. & Rohleder, N. 2009a. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations. Psychoneuroendocrinology (34) 469–485.

Nater, U. & Rohleder, N. 2009b. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. Psychoneuroendocrinology (34) 486–496.

Orion Diagnostica. Spectria Cortisol RIA coated tube radioimmunoassay – käyttöohje.

Pohjois-pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2011. Kortisoli, seerumista. Hakupäivä 7.9.2011.
http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=2129&terms=kortisoli

Rantanen, K. 2007. Stressi löytyi rottakokeissa. Helsingin sanomat. Hakupäivä 20.11.2011.
<http://www.hs.fi/omaelama/artikkeli/Stressi+l%C3%B6ytyi+rottakokeissa/HS20070205SI1TL024s7>

Rohleder, N. 2008. Salivary alpha-amylase as a marker for sympathetic nervous system activity. Hakupäivä 15.1.2011.
http://www.scitopics.com/Salivary_alpha_amylase_as_a_marker_for_sympathetic_nervous_system_activity.html

Ruttle, P. 2008. Stress and the role of Alpha-Amylase. Hakupäivä 14.1.2011.
<http://www.lepanoptique.com/sections/sciences/stress-and-the-role-of-alpha-amylase/>

Sane, T. 2000. Lisämunuaiset. Teoksessa L. Dunkel, T. Sane & M. Välimäki (toim.) Endokrinologia. Kustannus Oy Duodecim. Hämeenlinna: KaristoOy.

Salimetrics. 2011. Saliva Collection and Handling Advice. 2. painos. Hakupäivä 7.9.2011.
<http://www.salimetrics.com/assets/documents/spittips/publications/Saliva%20Collection%20Handbook.pdf>

Soininen, M. 1995. Tieteellisen tutkimuksen perusteet. Turun yliopiston täydennyskoulutuskeskuksen julkaisuja A:43.

Solunetti. 2006. Spektrofotometria. Hakupäivä 14.09.2011.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/spektrofotometria/>

Stauss, H. M. 2003. Heart rate variability. American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology (285) R927–R931.

Vartiovaara, I. 2008. Stressaa! Hyvä paha paine. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Yhtyneet Medix laboratoriot. 2011. Laboratoriokäsikirja. Hakupäivä 6.4.2011.

http://www.yml.fi/do.xsp?viewType=viewinfoview&objectType=complextype&directoryType=simple&complextypeOID=1123069386_13_f96d

LIITTEET

Liite 1: Kutsukirje

Liite 2: Haastattelulomake tutkimukseen osallistuvalle

Liite 3: Valmistautuminen tutkimukseen

Liite 4: Mittauspäiväkirja

Liite 5: Esimerkit tyypillisistä sykevälivaihtelu- ja sykekäyristä

Liite 6: Työohjeet: Spectria, Cortisol RIA

Liite 7: Työohjeet: Salimetrics, Salivary alfa-amylase

Liite 8: Kaikki mittaustulokset

KUTSUKIRJE

Olemme bioanalytiikan opiskelijoita Oulun seudun ammattikorkeakoulussa ja teemme opinnäytetyötä, jossa osallistumme syljen alfa-amylaasientsyymiä mittaavaan vieritestin kehitykseen. Tutkimme, onko entsyymi koholla pitkäaikaistressissä, ja voiko vieritestiä käyttää luotettavaan syljen alfa-amylaasin määrittämiseen. Apuna tutkimuksessa käytämme sykevälivaihtelumittausta sekä määritämme veren ja syljen kortisolipitoisuutta.

Tarvitsemme tutkimusryhmään 10 vapaaehtoista, jotka kokevat itsensä stressaantuneiksi. Tutkimus kestää yhden henkilön kohdalla yhden päivän ajan, jolloin tutkimushenkilöstä otetaan veri- ja sylkinäyte neljä kertaa, ja tutkittava pitää sykevälivaihtelumittaria yllään 24h. Henkilöiden tulee pitää päiväkirjaa päivän tapahtumista. Päiväkirjaan merkitään fyysinen aktiivisuus, psyykkisesti kuormittavat tapahtumat, palauttavat tapahtumat (esim. päiväunet tai tauko), unen kesto sekä laatu, ja mahdolliset lääkitykset sekä alkoholin käyttö. Tutkimus alkaa valitun päivän aamuna n. klo 12 ja kestää 24h.

Tutkimukseen osallistuvat henkilöt saavat tietää omat tutkimustuloksensa.

Näytteenottopaikka on koulumme palvelulaboratorio, 2.kerroksen C-siivessä. Näytteenottoon valmistautumisohjeet kerromme henkilökohtaisesti. Tutkimukseen liittyvät verikokeet eivät edellytä paastoa tms. Tutkimukseen voi osallistua yksi henkilö päivässä.

Tervetuloa tutkimukseen!

Terveisin,

Sanna Aho, Paula Haipus ja Iiris Väre
Oulun seudun ammattikorkeakoulu,
bioanalytiikan koulutusohjelma

HAASTATTELULOMAKE TUTKIMUKSEEN OSALLISTUVALLE

Nimi:

Syntymäaika pp/kk/vvvv:

Pituus:

Paino:

1. Kuinka stressaantuneeksi tunnette itsenne asteikolla 1-6? (Vastatkaa mahdollisimman totuudenmukaisesti)

Ei lainkaan	1	2	3	4	5	6	Erittäin
-------------	---	---	---	---	---	---	----------

2. Kuinka stressaantuneeksi tunnette itsenne asteikolla 1-6:

Työajallasi:	1	2	3	4	5	6
--------------	---	---	---	---	---	---

Töittesi jälkeen:	1	2	3	4	5	6
-------------------	---	---	---	---	---	---

Vapaa-ajallasi:	1	2	3	4	5	6
-----------------	---	---	---	---	---	---

3. Montako tuntia keskimäärin nukutte yössä? _____

4. Arvioi viimeaikainen unen laatusi asteikolla 1-6.

Erittäin hyvä	1	2	3	4	5	6	Erittäin huono
---------------	---	---	---	---	---	---	----------------

5. Kuinka väsyneeksi tunnette itsenne aamuisin?

En yhtään	1	2	3	4	5	6	Hyvin väsyneeksi
-----------	---	---	---	---	---	---	------------------

LIITE 2/2

	Täysin eri mieltä	Eri mieltä	Osittain eri mieltä	Osittain samaa mieltä	Samaa mieltä	Täysin samaa mieltä
6. Pidän päivän aikana rentouttavia taukoja	1	2	3	4	5	6
7. Stressini on jatkuvaa	1	2	3	4	5	6
8. Stressini on kausiluontoista	1	2	3	4	5	6
9. Minulla on ollut stressiä pitkään	1	2	3	4	5	6
10. Minusta tuntuu, että stressi aiheuttaa minulle fyysisiä oireita (esim. päänsärky, mahakipu, rytmihäiriöitä)	1	2	3	4	5	6

VALMISTAUTUMINEN TUTKIMUKSEEN

Näytteenottoaikataulu

klo. 12.00 Tutkimuksen aloitus

- sykevälivaihtelumittauksen aloitus
- sylkinäytteenotto
- verinäytteenotto

klo. 16.00

- sylkinäytteenotto
- verinäytteenotto

klo. 20.00

- sylkinäytteenotto
- verinäytteenotto

seuraava aamu

- sylkinäytteenotto 30 min päästä heräämisestä, ennen aamiaista ja hampaiden pesua

klo. 8.00 Tutkimuksen lopetus

- verinäytteenotto
- sykevälivaihtelumittauksen lopetus
- lomakkeiden palautus

Palauttakaa sininen lomake BBI-15 suljetussa kirjekuoressa. Psykologi tulkitsee lomakkeeseen antamanne vastaukset ja ottaa teihin yhteyttä.

Otamme teihin henkilökohtaisesti yhteyttä muiden tutkimustulosten ollessa valmiita. Annamme teille tutkimustulokset kirjallisessa muodossa.

Jos ette halua tutkimustuloksianne, olkaa ystävällisiä ja kertokaa siitä osallistuessanne tutkimukseen.

Näytteenotto-ohjeet

Ennen sylkinäytteenottoa koehenkilön on otettava huomioon seuraavat asiat:

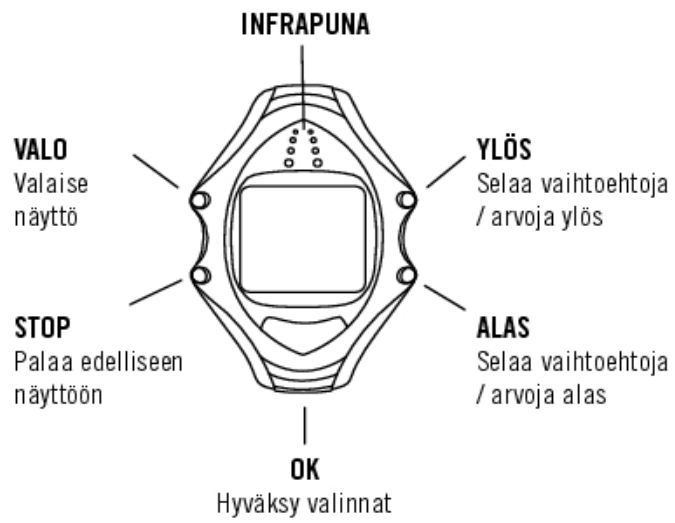
- Ei alkoholia 12 tuntiin
- Ei ruokailua tai juomista 1 tuntiin
- Ei maitotuotteita 20 minuuttiin
- Ei hampaiden pesua 45 minuuttiin
- Ei hammashoitola 48 tuntiin
- Suu huuhdellaan vedellä ruuantähteistä ja odotetaan 10 minuuttia, jotta vältettäisiin näytteen laimentuminen.
- Verinen sylki on hyödytön näyte

Ennen verinäytteenottoa koehenkilön on otettava huomioon seuraavat asiat:

Seerumista mitattavan kortisolin (S-Korsol) verinäytteenottoa varten ei tarvitse paastota. Yleisiä verinäytteenoton esivalmisteluohjeita tulee kuitenkin noudattaa, kuten rankan fyysisen rasituksen välttäminen ja aloillaan istuminen 15 minuutin ajan, verenkierron tasoittumiseksi.

Sykemittari

- Älä irrota sykevyötä edes suihkussa
- Sykemittarin kello ei saa kastua, joten ota kello kädestäsi suihkun ajaksi
- Suihkuun mentäessä kello on asetettava tarpeeksi lähelle (esim. muovipussiin), jotta signaali säilyy
- Sykemittari saattaa pysähtyä, jos vyö liikkuu paljon. Tällöin näet kellossa sykkeen kohdalla kaksi viivaa. Käynnistä mittaus uudestaan seuraavalla tavalla:
 - o STOP → ALAS (Exit) → OK
 - o Paina vielä OK, niin mittaus käynnistyy uudelleen



MITTAUSPÄIVÄKIRJA

Nimi _____
Mittauspvm ja - aloitus aika _____ klo. _____
☐ Työpäivä: Aloitus- ja lopetus aika _____
☐ Vapaa päivä

Mittausjakson tapahtumat

Fyysinen aktiivisuus (työty-, työmatka- tai vapaa-ajan liikunta)
Alku aika _____ Loppu aika _____

Psyykkisesti kuormittava tapahtuma (esim. kokous tai puheen pitäminen)
Alku aika _____ Loppu aika _____

Palauttava tapahtuma (esim. rentoutushetki, päiväunet tai tauko)
Alku aika _____ Loppu aika _____

Rentoutushetki

Jos mahdollista, pidä mittauspäivänä 15–30 min. rentoutumis- tai lepo hetki. Emme suosittele rentoutumista heti liikuntasuorituksen tai saunomisen jälkeen, koska syketaaso on silloin koholla. Kirjaa rentoutumishetki tämän lomakkeen palauttaviin tapahtumiin.

Unikysely

Kävin nukkumaan klo _____. Heräsin klo _____ (seuraavana aamuna).
Nukahtaminen kesti arviolta n. _____ (minuuttia / tuntia).

Koen nukkuneeni viime yönä
1 hyvin
2 melko hyvin
3 ei hyvin eikä huonosti
4 melko huonosti
5 huonosti

Häiritsikö sykelaitte untasi?

1 ei lainkaan 2 jonkin verran 3 paljon

Lääkitys / Alkoholi

Käyttikö tänään jotain lääkkeitä (lääkkeen nimi ja annostus)?

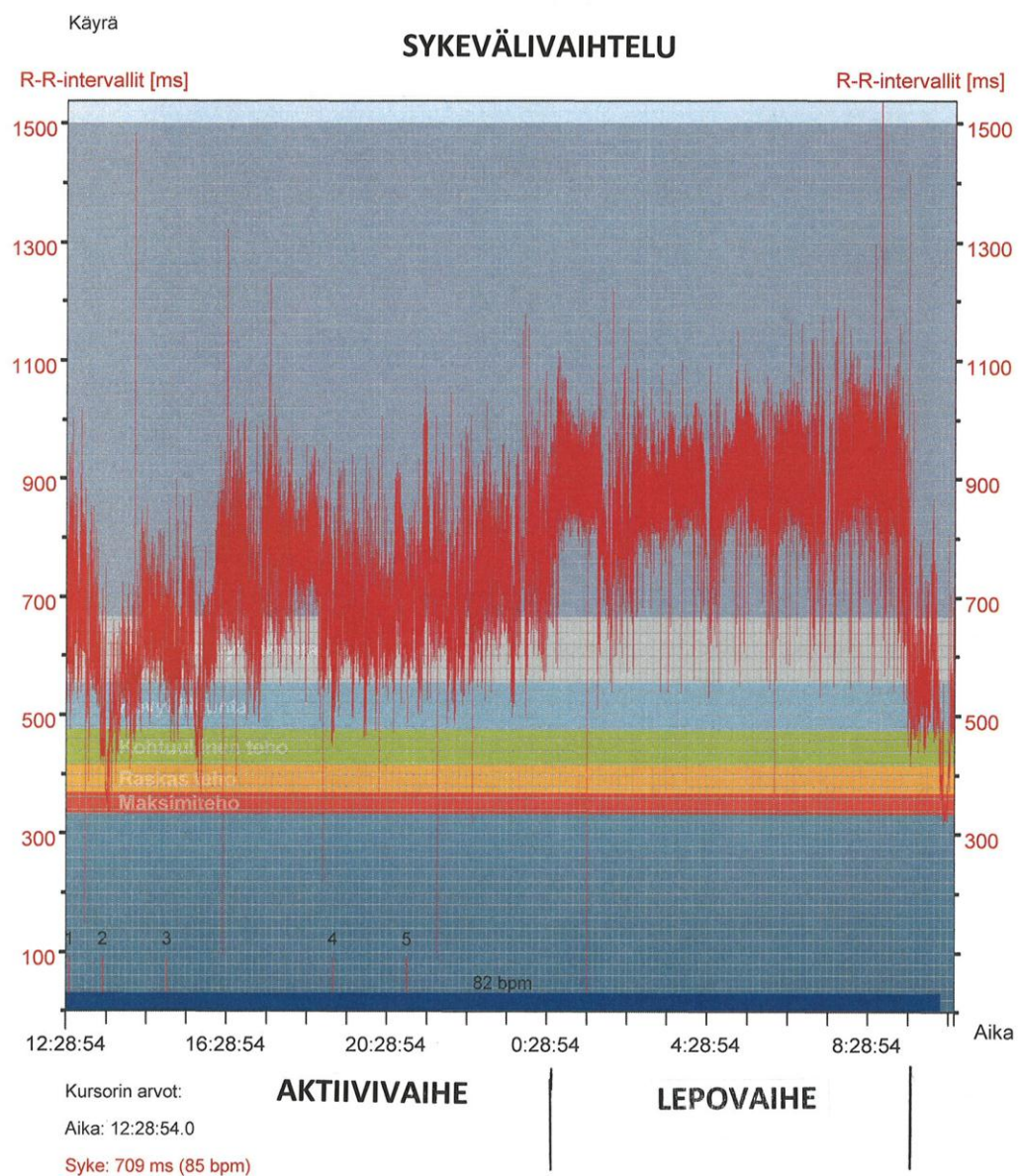
Käyttikö tänään alkoholia? Montako annosta?

(Tietty lääkkeitä ja alkoholi vaikuttavat sykkeeseen ja analyysin tuloksiin; siksi niiden mainitseminen on tärkeää!)

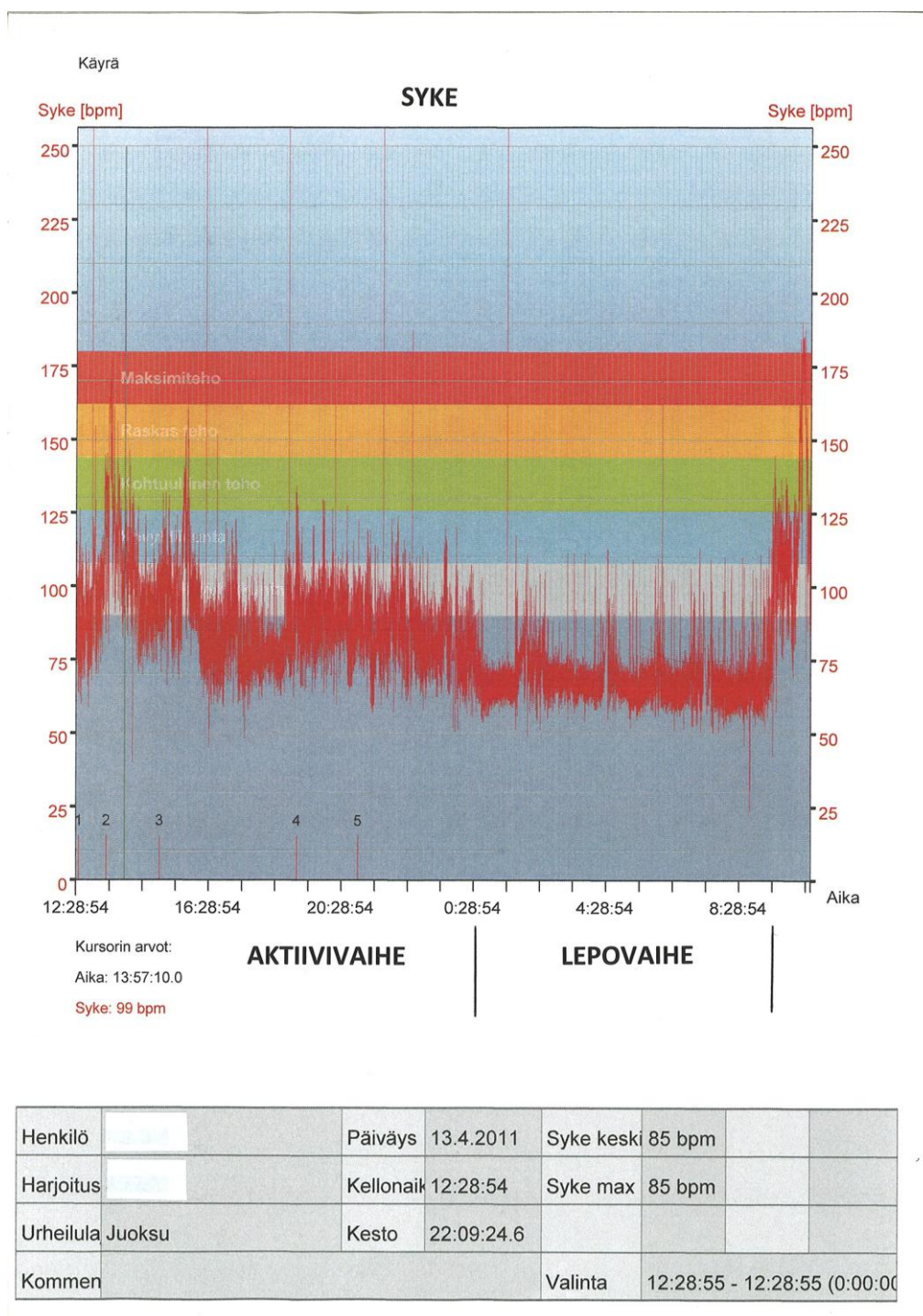
Muut huomiot

Lisäksi voit merkitä seuraavalle sivulle tapahtumia, jotka voivat vaikuttaa analyysin tuloksiin tai helpottaa tulosten tulkintaa, tai joista olet erityisen kiinnostunut. Merkitse ylös myös, jos oit mittarin jossain vaiheessa pois päältä ja kuinka pitkä tämä mittauskatko oli.

06.00	18.00
06.30	18.30
07.00	19.00
07.30	19.30
08.00	20.00
08.30	20.30
09.00	21.00
09.30	21.30
10.00	22.00
10.30	22.30
11.00	23.00
11.30	23.30
12.00	00.00
12.30	00.30
13.00	01.00
13.30	01.30
14.00	02.00
14.30	02.30
15.00	03.00
15.30	03.30
16.00	04.00
16.30	04.30
17.00	05.00
17.30	05.30



Henkilö		Päiväys	13.4.2011	Syke keski	82 bpm		
Harjoitus		Kellonaik	12:28:54	Syke max	0000 bpm		
Urheilula	Juoksu	Kesto	22:09:24.6				
Kommen				Valinta	12:28:55 - 12:28:55 (21:49:2		



TYÖOHJEET

Spectria**Cortisol RIA****Coated tube radioimmunoassay****Cat. No. 06119**

Reagenssit:

- Kalibraattorit: 0, 20, 75, 500 ja 2000 nmol/l
- Kortisolimerkkiaine: ^{125}I -leimattua kortisolia Tris-puskurissa. Radioaktiivisuus <250 Kbq.
- Puskuri: 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 0,2 % BSA
- Koeputkissa on jäniksen polyklonaalisia anti-kortisoli vasta-aineita.

Valmistelu

Lisää 500µl tislattua vettä viiteen kalibraattoripulloon. Sulje korkit ja sekoita hyvin kääntelemällä. Varo, ettei neste vaahtoa. Seisota kalibraattoripulloja puoli tuntia ennen käyttöä. Kalibraattorit, kontrollit ja potilasnäytteet määritetään kittiin kuuluvilla koeputkilla, joissa on anti-kortisoli vasta-aineita. Totaalimääritystä varten käytetään tyhjää koeputkea.

Suoritus seerumille

1. Sulata seeruminäytteet ja sentrifugoi niitä 15 minuuttia 3000 rpm:n kierrosnopeudella. Kaikkien potilasnäytteiden, reagenssien ja kontrollien tulee olla huoneenlämpöisiä.
2. Tee kaikista näytteistä rinnakkaismääritykset. Merkitse putket.
3. Pipetoi 20µl kalibraattoreita ja potilasnäytteitä sopiviin koeputkiin. Totaaliputket pysyvät vielä tyhjinä.
4. Lisää 500µl punaista kortisolimerkkiainetta jokaiseen putkeen, myös totaaliputkeen.
5. Sekoita vortexilla.
6. Peitä putket parafilmillä ja inkuboi näytteitä kaksi tuntia +37°C:n vesihauteessa. (On myös mahdollista inkuboida puoli tuntia. Tällöin on tärkeää pitää täsmälleen sama inkubointiaika kaikilla putkilla.)

7. Kaada ja napauta putkien sisältö imupaperiin. Älä kaada totaaliputken sisältöä pois.
8. Huuhtelee kaadetut putket 1 ml:lla tislattua vettä.
9. Sekoita näytteitä kääntelemällä.
10. Kaada ja napauta putkien sisältö imupaperiin. Älä kaada totaaliputken sisältöä pois. Jätä putket seisomaan nurinpäin imupaperin päälle ainakin 5 minuutin ajaksi. Lopuksi napauta vielä kerran, kunnes putket ovat tyhjiä.
11. Mittaa jokaista koeputkea gammalaskurilla ainakin 1 min ajan tai kunnes 10 000 mittausta on suoritettu yhdelle koeputkelle.

Suoritus syljelle

Koska kortisolin konsentraatio syljessä on hyvin matala, määrittystä ei voida tehdä samoin kuten seerumille. Määrittäksessä käytetään 2000 nmol/l kalibraattoria. Valmista seuraavat laimennokset puskuuriin: 0, 1.0, 4.0, 20 ja 100 nmol/l.

1. Sulata sylkinäytteet ja sentrifugoi ne kierrosnopeudella 2290 rpm kahden minuutin ajan. Kaikki potilasnäytteet, reagenssit ja kontrollit tulee olla huoneenlämpöisiä.
2. Tee kaikista näytteistä rinnakkaismääritykset. Merkitse putket.
3. Pipetoi 150 µl kalibraattoria ja potilasnäytteitä sopiviin koeputkiin. Totaaliputket pysyvät vielä tyhjinä.
4. Lisää 500µl punaista kortisolimerkkiainetta jokaiseen putkeen, myös totaaliputkeen.
5. Sekoita vortexilla.
6. Peitä putket parafilmillä ja inkuboi näytteitä puoli tuntia +37°C:n vesihauteessa.
7. Kaada ja napauta putkien sisältö imupaperiin. Älä kaada totaaliputken sisältöä pois.
8. Huuhtelee kaadetut putket 1 ml:lla tislattua vettä.
9. Sekoita näytteitä käsin.
10. Kaada ja napauta putkien sisältö imupaperiin. Älä kaada totaaliputken sisältöä pois. Jätä putket seisomaan nurinpäin imupaperin päälle ainakin 5 minuutin ajaksi. Lopuksi napauta vielä kerran, kunnes putket ovat tyhjiä.
11. Mittaa jokaista koeputkea gammalaskurilla ainakin 1 min ajan tai kunnes 10 000 mittausta on suoritettu yhdelle koeputkelle.

TYÖOHJEET

SALIMETRICS**SALIVARY α -AMYLASE ASSAY KIT****Catalog No. 1-1902**Reagenssit:

- α -Amylaasisubstraatti
- α -Amylaasikontrollit: Control High ja Control Low
- α -Amylaasi laimennin

Suoritus

1. Sulata sylkinäytteet ja sentrifugoi ne kierrosnopeudella 2290 rpm 2 min. Kaikki potilasnäytteet, reagenssit ja kontrollien tulee olla huoneenlämpöisiä.
2. Suunnittele kuoppalevyn täyttö. Orion suosittelee, että rivin ensimmäisillä paikoilla olisi Control High ja Control Low. Rivin kuusi viimeistä kuoppaa ovat näytteille.
3. Aseta tyhjä kuoppalevy inkuboitumaan spektrofotometrin inkubaattoriin +37°C:seen.
4. Aseta spektrofotometri mittaamaan ensimmäisen kerran 1 minuutin kuluttua ja seuraavan kerran 2 min kuluttua ensimmäisestä mittauksesta. Valitse 450 nm:n suodatin.
5. Sylkinäytteet laimennetaan α -amylaasilaimentimella.
Tee 1:10 laimennos. (10 μ l sylkinäyte + 90 μ l laimennin). Sekoita hyvin.
Tee 1:20 laimennos. (Jatka 1:10 laimennosta: 10 μ l 1:10 + 190 μ l laimennin)
Tee 1:200 laimennos. (Jatka 1:20 laimennosta: 10 μ l 1:20 + 90 μ l laimennin)
6. Lämmitä α -amylaasi substraatti +37°C:ssa. Pidä huoli, että substraatti on kauttaaltaan lämmin ja sekoitettu huolellisesti ennen käyttöä.
7. Tarkan ajan saamiseksi mitataan ensin yksi rivi kerrallaan. Lisää 8 μ l kontrolleja (High & Low) ja sylkinäytteitä kaivoihin. Pipetoi käänteisesti välttämällä ilmakuplia.
8. Lisää 320 μ l esilämmitettyä substraattia jokaiseen kaivoon automaattipipetillä. Vaihda aina pipetinkärkeä, älä pipetoi jäljellä olevaa substraattia takaisin pulloon. Tämä voi kontaminoida reagenssin ja häiritä mittaustuloksia. Jos kaivossa on kuplia mittauksen aikana, tutkimus uusitaan.
9. Aseta kuoppalevy välittömästi spektrofotometriin ja aloita mittaus.

Laskukaava alfa-amylaasin aktiivisuudelle näytteessä:

$$\frac{\Delta \text{ Abs/min} \times \text{TV} \times \text{DF}}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/ml}$$

Jossa:

$\Delta \text{Abs/min}$ = Absorbanssiero minuutissa

TV = Kokonaistilavuus (0,328 ml)

DF = Laimennoskerroin

MMA = 2-kloro-para-nitrofenolin millimolaarinen absorptio

SV = Näytetilavuus (0,008 ml)

LP = Valon matka mitattavassa liuoksessa (light path) (0,97)

KAIKKI MITTAUSTULOKSET

Seerumin kortisolipitoisuus nmol/l, tutkimushenkilöittäin eri näytteenottoaikoina

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
klo 12	419,4	309,4	261,9	291,3	432,1	258,2	536,0	309,6	594,8	177,2
klo 16	289,5	217,2	266,4	335,5	487,6	264,1	320,4	574,5	151,6	224,7
klo 20	105,4	102,0	102,2	108,7	256,3	52,2	234,3		220,4	93,8
klo 8	581,4	269,8	342,5	407,8	606,8	514,1	739,3	704,5	273,0	472,6

Syljen kortisolipitoisuus nmol/l, tutkimushenkilöittäin eri näytteenottoaikoina

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
klo 12	7,6	4,3	5,0	3,0	7,9	2,0	6,6	7,4	21,7	2,6
klo 16	3,7	2,0	5,3	5,3	13,8	2,4	3,1	12,3	2,1	3,4
klo 20	0,7	0,5	0,8	out	2,5	0,0	2,0		5,2	1,6
klo 8	27,1	11,5	30,3	20,7	9,3	10,6	12,4	18,2	28,6	25,9

Syljen alfa-amylaasientsyymien aktiivisuus U/l, tutkimushenkilöittäin eri näytteenottoaikoina

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
klo 12	97	119	132	242	149	85	61	165	242	203
klo 16	160	103	106	192	125	167	49	142	193	132
klo 20	178	77	182	151	182	132	68		194	147
klo 8	34	20	65	161	52	76	18	87	88	50